

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura

PROPUESTA DE UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS
PARA PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS
FARMACÉUTICOS NO ESTERILES

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR:
ROBERT WILLIAM ARCHILA JIMENEZ

MARZO DE 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA MICROBIOLOGICA

MSc. Coralia González de Díaz

ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS

FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS

MSc. Rocio Ruano de Sandoval

DOCENTES DIRECTORES

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A MI AMADO DIOSITO TODOPODEROSO

Por darme la sabiduría, la capacidad y la voluntad de poder salir adelante, por darme esa fuerza de enfrentar de la mejor manera este largo camino porque a pesar de todo Él nunca me desamparó y estuvo siempre a mi lado.

A MIS PADRES

Carlos Archila Guillén y Nicolasa Santos de Archila, a quienes amo y agradezco mucho por darme los principios morales, espirituales, su apoyo incondicional y por su amor infinito que me llenó de fuerza en los momentos más difíciles de mi formación personal y profesional.

A MIS ASESORES

MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos

MSc. Amy Elieth Moran Rodríguez

A quienes agradezco infinitamente por brindarme el tiempo, el interés, la dedicación, la paciencia y la orientación para la elaboración de mi trabajo de graduación.

A TODAS LAS PERSONAS QUE ME BRINDARON SU APOYO EN TODO

MOMENTO

DEDICATORIA

A MI AMADO DIOSITO TODOPODEROSO

Por caminar siempre a mi lado y sostenerme con sus manos y ayudarme a salir a delante en los momentos difíciles de mi vida permitiéndome así cumplir una nueva meta.

A MIS PADRES

Por darme la oportunidad de formarme profesionalmente y abrir nuevos caminos en mi vida.

A MIS HERMANOS

Carlos Danilo y José Alberto, quienes creyeron en mí en todo momento y me dieron palabras de aliento, impulsándome siempre con su cariño a seguir adelante.

“GRACIAS QUE DIOSITO LOS BENDIGA”

INDICE

RESUMEN

CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN

xiii

CAPITULO II

II. OBJETIVOS

CAPITULO III

3.0 Marco Teórico

3.1 Manuales de procedimientos

17

3.2 Microorganismos indicadores

18

3.3 Limites microbianos

20

3.4 Características de los microorganismos

20

3.5 Acreditación

26

3.6 Funciones de un organismo de inspección acreditado

27

3.7 Laboratorios acreditados que realizan análisis microbiológicos en
medicamentos en El salvador

28

CAPITULO IV

4.0 Diseño metodológico

31

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS

5.1 Diagnóstico realizado a los laboratorios acreditados en análisis en
medicamentos en El Salvador

35

| | |
|---|-----|
| 5.2 Manual de procedimientos Normalizados | |
| 5.2.1 Prueba preparatoria | 48 |
| 5.2.2 Pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles: | |
| 5.2.2.1 Para muestras sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente | 59 |
| 5.2.2.1.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 5.2.2.1.1.1 Método en placa | 60 |
| 5.2.2.1.1.2 Método tubos múltiples | 69 |
| 5.2.2.1.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 78 |
| 5.2.2.1.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 87 |
| 5.2.2.1.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 99 |
| 5.2.2.1.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 108 |
| 5.2.2.1.6 Recuento total combinado de hongos y levaduras | 117 |
| 5.2.2.2 Para muestras líquidas en solución o suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico con menos del 30% y sólidos de disolución fácil | 125 |
| 5.2.2.2.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 5.2.2.2.1.1 Método en placa | 126 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.2.2.1.2 Método tubos múltiples | 135 |
| 5.2.2.2.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 143 |
| 5.2.2.2.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 152 |
| 5.2.2.2.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 163 |
| 5.2.2.2.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 172 |
| 5.2.2.2.6 Recuento total combinado de hongos y levaduras | 180 |
| 5.2.2.3 Para muestras de ceras, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua. | 188 |
| 5.2.2.3.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 5.2.2.3.1.1 Método en placa | 189 |
| 5.2.2.3.1.2 Método tubos múltiples | 199 |
| 5.2.2.3.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 209 |
| 5.2.2.3.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 219 |
| 5.2.2.3.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 231 |
| 5.2.2.3.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 242 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.2.3.6 Recuento total combinado de hongos y levaduras | 252 |
| 5.2.2.4 Para muestras líquidas en forma de aerosol | 261 |
| 5.2.2.4.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 5.2.2.4.1.1 Método en placa | 262 |
| 5.2.2.4.1.2 Método tubos múltiples | 272 |
| 5.2.2.4.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 282 |
| 5.2.2.4.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 293 |
| 5.2.2.4.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 306 |
| 5.2.2.4.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 317 |
| 5.2.2.4.6 Recuento total combinado de hongos y levaduras | 328 |
| 5.3 Requerimientos con los que debe contar un laboratorio para obtener la acreditación | |
| 5.3.1. Requerimientos de gestión (administración) | 338 |
| 5.3.2. Requerimientos técnicos | 344 |
| 5.4 Lineamientos para la acreditación | 349 |

CAPITULO VI

6.0 Discusión de resultados

CAPÍTULO VII

7.0 Conclusiones

CAPITULO VIII

8.0 Recomendaciones

BIBLIOGRAFIA

GLOSARIO

ANEXOS

ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ATCC | Colección de Cultivos Tipo Americanos |
| CONACYT | Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología |
| °C | Grados Centígrados |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| IEC | Comisión Electrotécnica Internacional |
| ISO | Organización Internacional de Estandarización |
| mL | mililitros |
| μL | microlitros |
| μm | micrómetros |
| NMCC | Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad |
| NMP | Número Más Probable |
| spp | Especie |
| TSA | Agar Tripticasa Soya |
| TSI | Agar Hierro Triple Azúcar |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonia |
| XLD | Agar Xilosa Lisina Desoxicolato |

RESUMEN

Todo laboratorio que realiza análisis microbiológicos debe de reunir ciertos requisitos y condiciones para poder realizar de la mejor manera sus funciones, estos requisitos hacen referencia a la infraestructura, condiciones ambientales, equipo, procedimientos normalizados y otros aspectos no menos importantes, para garantizar la credibilidad de los resultados de los análisis. Es por ello que en el presente trabajo se recopiló la información necesaria para obtener un buen funcionamiento y la acreditación de los mismos. Lo primero fue conocer los laboratorios microbiológicos acreditados que realizan análisis en medicamentos; y mediante una entrevista se evaluó la importancia de la acreditación de los procedimientos de análisis microbiológico.

Posteriormente se propone el manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico correspondiente a las pruebas de Límites microbianos para productos farmacéuticos no estériles, siguiendo los parámetros establecidos por la norma ISO/IEC 17025:05, por lo tanto el manual cumple con dicho requisito. Además, se dan a conocer los requerimientos y lineamientos que se necesitan para poder obtener el reconocimiento como laboratorio acreditado.

De esta manera se elaboró una guía de referencia para cualquier laboratorio que realice análisis microbiológicos que busque mejorar sus condiciones de trabajo.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la industria farmacéutica existe una gran variedad de sustancias medicinales cuya finalidad es mantener o restablecer la salud del hombre. La garantía de calidad reviste una importancia especial, y esta fabricación debe seguir estrictamente métodos de preparación y procedimientos establecidos y validados cuidadosamente. Se sabe que los productos farmacéuticos pueden llegar a ser contaminados por varios elementos en diferentes puntos a lo largo de la línea de manufactura; la carga microbiana de los productos finales puede representar la contaminación de las materias primas, de los equipos con los cuales fueron elaborados, del ambiente, de las personas que operaron durante el proceso o de los envases dentro de los cuales fueron empacados. Algunos de estos contaminantes pueden ser patógenos, mientras que otros pueden desarrollarse en presencia de preservantes y afectar el producto. Por lo que en este trabajo se presenta un manual, en el cual se describen los procedimientos de análisis microbiológicos correspondientes a las pruebas de Límites microbianos para productos farmacéuticos no estériles dadas por la Farmacopea 27 de los Estados Unidos de América, las cuales comprende: recuento total de microorganismos mesófilos aerobios, recuento total de hongos y levaduras, determinación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, determinación de *E. coli* y *Salmonella*; con el fin de facilitar la realización del análisis microbiológico a estos productos. Además, se presentan

los requerimientos y lineamientos para la acreditación de un laboratorio de control de calidad microbiológico, para que los procedimientos que se realicen tengan toda la validez y credibilidad que estos requieren.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Proponer un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar un diagnóstico con la ayuda de una entrevista a los Laboratorios Acreditados que se encuentran en el país, que realizan análisis microbiológico en medicamentos.

2.2.2 Recopilar la información bibliográfica necesaria para la elaboración de procedimientos microbiológicos en pruebas de límites microbianos a productos farmacéuticos no estériles.

2.2.3 Establecer los diagramas de procedimientos y métodos normalizados a ser utilizados en las pruebas de límites microbianos.

2.2.4 Dar a conocer los lineamientos y requerimientos a seguir para la acreditación de un Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en medicamentos.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 MANUALES DE PROCEDIMIENTOS.

Un manual se define como un instrumento al servicio de la calidad y de la capacitación que involucra a todo el personal de laboratorio, en el cual se describen las actividades que deben seguirse en la realización de las funciones, y cuyo propósito es pasar de una tradición oral a una escrita (8).

Para asegurar que la información generada por los resultados del laboratorio sea precisa y oportuna, se propone incluir la normalización y estandarización de los procedimientos.

Un procedimiento corresponde a la descripción precisa, concisa y clara del material, equipo, condiciones, actividades y requerimientos para obtener un producto o servicio de una calidad definida.

Operacionalizar los estándares, garantizar la reproducibilidad de los procesos, capacitar el personal, armonizar las técnicas, hablar el mismo idioma, reducir costos y errores, facilitar auditorías, son las funciones esenciales del manual de procedimientos o guía de buena ejecución de los análisis.

Cada uno de los procedimientos debe cumplir con los siguientes requisitos (8):

- Elaborado por un personal experimentado y responsable.
- Dirigido a un personal capacitado.
- Acorde a las normas actuales del país o institución.
- Idóneo y consensual.

- Detallado, claro y preciso.
- Exhaustivo.
- Instrucciones inequívocas.
- Accesible y llamativo.

El contenido de los procedimientos debe complementar ⁽⁸⁾:

- Titulo.
- Fecha de implementación.
- Principios y fundamentos.
- Equipo, instrumentos y reactivos.
- Procedimientos detallados.
- Interpretación de resultados.
- Emisión y entrega de los resultados.
- Referencias bibliográficas.
- Glosario de términos.

3.2 MICROORGANISMOS INDICADORES

Los microorganismos indicadores son aquellas especies cuya presencia indica que los medicamentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieron determinar la llegada a los mismos, de microorganismos peligrosos y permitir la proliferación de especies patógenas o toxigénicas ⁽⁹⁾.

La finalidad por la que se usan los microorganismos indicadores como reveladoras de prácticas de higiene inadecuadas es precisamente para poner de manifiesto determinadas condiciones de tratamiento o manipulación de los medicamentos que suponen un peligro potencial.

Los microorganismos de este género más comunes son los siguientes:

-Bacterias aerobias mesófilas: Son microorganismos que crecen a 37° C y cuyos recuentos se obtienen en placas, los cuales, si son altos, indican la posible proliferación de organismos patógenos dentro de los medicamentos y al mismo tiempo, indican que los medicamentos van a alterarse muy pronto.

-***Escherichia coli*** y coliformes: La ***E. coli*** es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre, por lo tanto, su presencia en los medicamentos, es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal, lo que implica la presencia simultánea de bacterias patógenas como ***Salmonella typhi*, *Shigella spp*, *Vibrios spp* y *Entamoeba spp*** (estas últimas no se analizan comúnmente en el laboratorio a los productos farmacéuticos no estériles).

Los coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada o de una industrialización o tratamiento de medicamentos incorrectos, favoreciendo la multiplicación de microorganismos patógenos.

-***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** en medicamentos se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca y fosas

nasales de los manipuladores de los medicamentos, así como también de material, equipos sucios y de ineficiente temperatura de conservación (9).

3.3 LIMITES MICROBIANOS

Los límites microbianos son las pruebas por medio de las cuales se estima un número de microorganismos aerobios, mohos y levaduras presentes en especialidades farmacéuticas y determinar si dichas especialidades están exentas de ciertos microorganismos patógenos, estas especialidades incluyen:

Materia Prima

Producto en Proceso

Producto Terminado.

Esta es una prueba que permite darle protección al consumidor, ya que asegura la calidad microbiológica del producto. Por lo que la industria farmacéutica reconoce la necesidad de un control microbiológico de estos productos desde el punto de vista: salud pública, estabilidad del producto y financiero (4).

3.4 CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS.

-Escherichia coli₍₁₄₎

Es un bacilo corto que puede formar cadenas y que reacciona negativamente a la tinción de Gram. Es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es +++.

E. coli y la mayor parte de las bacterias intestinales forman colonias circulares convexas y lisas con bordes definidos. La **E. coli O157:H7** es una de cientos de cepas de la **E. coli**. Aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar una enfermedad grave. Se diferencia de las otras **E. coli** en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β -glucuronidasa.

-E. coli enteropatogénica (ECEP): Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo. ECEP interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia / destrucción” o lesión A/E. La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37° C con un intervalo de crecimiento de 4 a 10°C. Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5 con un pH mínimo y máximo de crecimiento de 4.0 y 8.5 respectivamente.

-Staphylococcus aureus⁽¹⁴⁾

Los **Staphylococcus** son células esféricas, gram positivas, cuyo diámetro varía de 0.5 a 1.5 μm ; en frotis teñidos aparecen en grupos irregulares en forma de racimos. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos; la temperatura de crecimiento es de 30° a 37° C; no son móviles y no forman esporas.

El **S. aureus** es una bacteria gram positiva redondeada, que aparece como elemento aislado, formando parejas tétradas o agrupaciones irregulares en

forma de racimos. Pertenece a la familia ***Micrococaceae***. Dentro del género, se reconocen al menos 20 especies diferentes, siendo el ***S. aureus*** la que con más frecuencia produce infecciones en el hombre.

Los ***Staphylococcus*** se tiñen fácilmente con colorantes básicos y son fuertemente gram positivos. La mayoría de las cepas no son capsuladas, sin embargo, el ***S. aureus*** forma cápsulas; morfológicamente puede ser evidente, o bien detectarse mediante métodos inmunológicos.

En medios sólidos el crecimiento es abundante; las colonias son desde translúcidas a opacas, con algunas variaciones en el perfil y en el margen de la colonia; estas variaciones son útiles para la diferenciación.

Algunos ***Staphylococcus*** producen pigmentos carotenoides, formando colonias de color amarillo-dorado, amarillo-limón o cremoso. La pigmentación se da más a menudo en ***S. aureus***, siendo más o menos constante en los aislados primarios.

S. aureus forman colonias grises a amarillo dorado intenso, producen catalasa, fermentan con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas.

-Pseudomonas aeruginosa₍₁₁₎

Pseudomonas aeruginosa (o ***Pseudomonas pyocyanea***) es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista para los humanos, lo es también para las plantas.

La ***Pseudomona aeruginosa*** es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor a grapa ***in vitro***. La identificación definitiva frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como su habilidad de crecer a 42 °C.

La biosíntesis de piocianina es regulada por mecanismos homeostáticos, asociada a la colonización de ***P. aeruginosa*** en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística.

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre ⁽¹¹⁾.

-*Salmonella spp.*⁽¹¹⁾

Las ***Salmonellas*** son bacilos gram negativos, la mayor parte de ellas son móviles y tiene flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen con facilidad en medios sencillos, pero casi nunca fermentan la lactosa o la sacarosa, forman ácido y a veces gas a partir de la glucosa y manosa, suelen producir H₂S, sobreviven a la congelación en el agua durante periodos prolongados, son resistentes a ciertos productos químicos (Ej. verde brillante, tetracionato de sodio y desoxicolato de sodio) que inhiben a otras bacterias intestinales; por lo tanto estos compuestos son de utilidad para su inoculación en los medios de cultivo con objeto de aislar a ***Salmonella spp*** del excremento.

-Hongos⁽⁹⁾

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso; la parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color humo.

El talo o cuerpo vegetativo de los mohos está formado por una masa filamentososa ramificada y entrelazados llamados hifas denominándose micelio al conjunto de estas hifas.

En general en comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, la mayoría de mohos necesitan menor cantidad de humedad disponible.

La mayoría de los mohos podrían considerarse, mesófilos, es decir que son capaces de crecer bien a temperaturas normales. Para la mayoría de los mohos la temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 25 a 30 °C, aunque algunos crecen bien a temperaturas comprendidas entre los 35 y los 37 °C ó a temperaturas superiores. Algunos mohos son psicótrofos, es decir crecen bastante bien a temperaturas inferiores a la de congelación. Unos pocos son termófilos, es decir crecen a temperaturas elevadas.

Los mohos son aerobios, necesitan de oxígeno para crecer, esto es cierto por lo menos en los mohos que crecen en la superficie. Casi todos los mohos capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de concentraciones de iones H^+ (pH comprendido entre 2 y 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido.

-Levaduras⁽⁹⁾

El termino levadura se emplea de forma habitual, si bien su definición resulta difícil. En el sentido que aquí se emplea, se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide u esferoide y que se reproducen por gemación o por fisión.

-Caracteres morfológicos.

Forma y estructura. La forma de las levaduras pueden ser desde esféricas hasta ovoides alimonada, periforme cilíndrica, triangular e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio. Se diferencian también en cuanto a su tamaño.

-Caracteres de los cultivos.

En la mayoría de los casos, el crecimiento en masa de las levaduras no resulta apropiado para identificar estos microorganismos, no obstante, el aspecto del crecimiento de los microorganismos tienen importancia cuando estos producen un moteado pigmentado en la superficie.

Las Levaduras son oxidativas, fermentativas o bien su actividad metabólica es a la vez ambos tipos. En la superficie de un líquido, las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de película, de velo o de espuma y por ello se denominan levaduras formadoras de películas.

-Propiedades fisiológicas.

La mayoría de las levaduras necesitan más humedad que los mohos.

El intervalo de temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general parecido a la de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25- 30 °C y una temperatura máxima en torno a los 35-47 °C.

Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0 °C o inferiores. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos.

Las levaduras crecen mejor en aerobiosis aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente en anaerobiosis.

3.5 ACREDITACIÓN ⁽⁵⁾

La acreditación es el procedimiento mediante el cual un organismo autorizado reconoce formalmente que una organización es competente para la realización de una determinada actividad de evaluación de la conformidad ⁽²⁾.

Es un reconocimiento legal que otorga el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), a todo laboratorio de calibración y ensayo, que cumple con la Norma ISO/IEC 17025, en la que se plantean los requerimientos necesarios , para demostrar que este opera bajo un sistema de calidad, que es técnicamente competente y es capaz de generar resultados técnicamente validados.

La acreditación garantiza que los organismos de evaluación de la conformidad de distintos países desempeñen su tarea de manera equivalente, ya que se

ajustan en todo momento a las normas, guías y criterios de acreditación vigentes que se aplican internacionalmente, generando la adecuada confianza y competencia técnica que posibilita la aceptación mutua de resultados. Es interesante hacer ver a las organizaciones los beneficios que pueden alcanzar, por tanto se les invita a tratar de adaptar sus actuaciones a estas nuevas estructuras.

La acreditación es considerada actualmente como una herramienta clave para facilitar el comercio internacional por su capacidad para eliminar las barreras técnicas y para abaratar los costos de evaluación, ya que generan un clima de confianza internacional en los entes de acreditación encargados de la evaluación de la conformidad; también, permiten que un producto o servicio evaluado una vez en el país exportador sea aceptado como conforme en los mercados importadores.

3.6 FUNCIONES DE UN ORGANISMO DE INSPECCIÓN ACREDITADO ⁽⁵⁾

Dentro de las actividades que un organismo de inspección puede realizar se encuentran:

- El examen de materiales, productos, instalaciones, plantas, procesos, procedimientos de trabajo, y servicios
- La determinación de su conformidad con los requisitos, y el subsecuente informe de resultados de estas actividades a los clientes.

Para acreditar a un organismo de inspección es necesario que éste cumpla con los siguientes requisitos:

- Ser una entidad legalmente identificable.
- Tener implementado un sistema de calidad al interior de su organización, de acuerdo a la norma internacional requerida.
- Contar con un personal idóneo para su actividad.
- Poseer una infraestructura según el alcance de su operación.
- Cumplir los requisitos establecidos por el organismo de acreditación.
- Conocer los documentos exigidos por el organismo de acreditación, tales como: procedimiento de acreditación, reglamento de acreditación, la norma NSR ISO 17020 “Criterios generales para la operación de varios tipos de organismos que desarrollan la inspección” y las tarifas.
- Contar con laboratorios acreditados para realizar los ensayos que apoyan la actividad de inspección, estos ensayos pueden ser realizados por el laboratorio del organismo de inspección o por laboratorios subcontratados.

3.7 Laboratorios Acreditados para Análisis en Medicamentos.

3.7.1 Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC)

Laboratorios Especializados en Control de Calidad, LECC.

Es un laboratorio de referencia en el control de calidad para las diversas industrias y organismos gubernamentales y no gubernamentales de la región centroamericana.

Actualmente, el campo de actividad de LECC comprende la realización de análisis que comprueben la calidad, seguridad y eficacia de medicamentos, aguas, cosméticos, alimentos, productos de origen natural y otros productos químicos, para lo cual, realiza análisis microbiológicos y/o fisicoquímicos, según sea requerido por el cliente.

Desde su fundación, se ha mantenido un acelerado crecimiento mediante la adquisición de equipo de alta tecnología, aumento en el personal, mejora de las instalaciones y diversificación de servicios, iniciando en el ámbito farmacéutico y ampliándolos a análisis de aguas y alimentos, estudios microbiológicos ambientales, desarrollo de perfiles de disolución, puesta a punto y validación de metodología analítica, entre otros.

Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC) fue fundado en 1986. Durante toda su trayectoria se ha comprometido con la satisfacción integral de sus clientes, lo cual se manifiesta en la constante innovación de los servicios y la adopción de normativa internacional cada vez más exigente, como lo demuestra el logro y mantenimiento de la acreditación bajo la norma ISO 17025 en cada una de sus versiones, desde 2002.

3.7.2 Laboratorios de Especialidades Microbiológicas Industriales (ESMI)

Laboratorio autorizado por el Consejo Superior de Salud Pública de El Salvador, bajo el número Trescientos cincuenta y siete (357).

Laboratorio acreditado por CONACYT bajo la norma ISO/IEC 17025 versión 2005 para la realización de análisis fisicoquímico en aguas y microbiológico en alimentos, medicamentos y aguas, establecidos en el ámbito de acreditación.

REGISTRO No.: LEA-05:02.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

IV. DISEÑO METOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio que se realizó en esta investigación es de tipo bibliográfico retrospectivo.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRAFICA

En esta parte se recopiló toda la información teórica relacionada con la elaboración de manuales, información sobre los microorganismos relacionados con las pruebas de límites microbianos, así como también los procedimientos de identificación; al mismo tiempo se investigaron aspectos relacionados con la acreditación de laboratorios como requerimientos y lineamientos necesarios para su obtención; para ello fue necesario consultar la norma ISO/IEC 17025:05.

La bibliografía consultada se obtuvo de diferentes fuentes como:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT)
- Internet

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

En la investigación de campo se efectuó una entrevista a los laboratorios acreditados que llevan a cabo análisis microbiológicos en medicamentos, con el fin de realizar un diagnóstico sobre la importancia de obtener la acreditación y la importancia del manual de procedimientos de análisis microbiológicos; para ello

se utilizó un instrumento que contiene las preguntas que sirvieron para obtener la información (ver anexo N° 1).

4.4 ELABORACION DEL MANUAL

Con la información recopilada se elaboraron los procedimientos microbiológicos normalizados para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles, las cuales incluyen las siguientes pruebas:

- Recuento total de microorganismos aerobios.
- Determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus***.
- Determinación de ausencia de ***Pseudomona aeruginosa***.
- Determinación de ausencia de ***Salmonella spp.***
- Determinación de ausencia de ***Escherichia coli***.
- Recuento total de hongos y levaduras.

Los procedimientos se elaboraron de acuerdo a lo establecido por la Farmacopea 27 de los Estados Unidos de América y en base al formato dado por la norma ISO/IEC 17025:05 (ver anexo N° 2).

CAPITULO V
RESULTADOS

5.1 DIAGNOSTICO REALIZADO A LABORATORIOS ACREDITADOS EN ANALISIS DE MEDICAMENTOS EN EL SALVADOR.

Para obtener la información necesaria para elaborar el manual de procedimientos para el laboratorio de microbiología; y conocer la importancia de realizar análisis microbiológicos acreditados a los medicamentos no estériles, se utilizó una serie de preguntas recopiladas en un instrumento para efectuar la entrevista a los encargados de los laboratorios de microbiología, en los laboratorios acreditados.

Los resultados de la entrevista se presentan a continuación:

1. ¿Considera indispensable la acreditación de los ensayos realizados a los medicamentos no estériles?

| | |
|----|----|
| L1 | Sí |
| L2 | Sí |

Los medicamentos son destinados para mejorar la salud de la población por lo que deben de ser analizados de una manera eficaz, que garantice la calidad del resultado.

2. ¿El laboratorio cuenta con la acreditación de los procedimientos microbiológicos realizados a los medicamentos?

| | |
|----|----|
| L1 | Sí |
| L2 | Sí |

Hoy en día los laboratorios deben de demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables, adecuados para su finalidad y propósitos perseguidos, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan.

3. ¿Qué procedimientos de análisis se encuentran acreditados?

| | |
|----|-----------------------------|
| L1 | Recuento Total de Bacterias |
| L2 | Recuento Total de Bacterias |

El recuento total de bacterias es uno de los procedimientos que se realiza a los medicamentos no estériles y que esta destinado para evaluar la carga microbiana a la cual ha sido expuesta el medicamento en toda su elaboración.

4. ¿A que tipo de instituciones prestan sus servicios analíticos?

| | |
|----|--|
| L1 | ISSS, Laboratorios Farmacéuticos Nacionales |
| L2 | A toda institución y empresa que lo solicite |

Los laboratorios brindan sus servicios de análisis a toda institución que se los solicite, entre las cuales se encuentran instituciones reconocidas que confían en el buen funcionamiento del sistema de calidad de estos laboratorios.

5. ¿Realizan análisis a instituciones internacionales? ¿cuáles?

| | |
|----|---|
| L1 | Sí, Laboratorios Farmacéuticos Hondureños |
| L2 | No. |

La acreditación de los procedimientos contribuye a que estos laboratorios sean tomados en cuenta por otros países para brindar sus servicios.

6. ¿Cuánto tiempo llevó efectuar el proceso para obtener el reconocimiento de acreditación?

| | |
|----|---|
| L1 | 4 meses, desde que se presentó la solicitud hasta que se obtuvo el reconocimiento de acreditación |
| L2 | 2 años, desde el inicio del proceso hasta el otorgamiento del reconocimiento de acreditación. |

El tiempo que se puede tardar en obtener un procedimiento acreditado depende en gran medida, de que tan implantado tiene el laboratorio su sistema de gestión de calidad, ya que los laboratorios presentan la solicitud y son evaluados por las entidades competentes (en nuestro país es el CONACYT); las cuales dictan sus conformidades y no conformidades; y otorgan el reconocimiento como laboratorio acreditado.

7. ¿Qué ventajas y/o desventajas ha presentado el laboratorio desde que obtuvo su acreditación?

| | |
|----|---|
| L1 | <p>Ventajas: Ser tomados en cuentas por algunas instituciones para realización de los análisis.</p> <p>Desventaja: A nivel farmacéutico no hay mayores ventajas porque no hay una entidad que exija que los análisis realizados a los medicamentos deban hacerse en laboratorios acreditados.</p> |
| L2 | <p>Ventajas: Tener un sistema de Gestión de Calidad reconocido y confiable y aumento en el número de clientes.</p> <p>Desventaja: Los elevados costos para mantener la acreditación.</p> |

Las ventajas de contar con procedimientos acreditados es la ampliación de su mercado, ser reconocidos como laboratorios confiables pero los elevados costos de obtener y mantener su acreditación es la mayor desventaja a la que se han enfrentado estos laboratorios; ya que tienen que estar en mejoras continuas. Otra desventaja es que a nivel farmacéutico no se encuentra una entidad que exija que los análisis realizados a los medicamentos deban hacerse en laboratorios acreditados.

8. ¿Cuenta el laboratorio con manual de procedimientos para el análisis microbiológico de los medicamentos? ¿Desde cuándo?

| | |
|----|--|
| L1 | Sí, desde que inicio operaciones en 1,986. |
| L2 | Sí, desde hace 12 años. |

Todo laboratorio destinado a la realización de análisis debe de elaborar un manual de procedimientos en el cual se detallan todos los procedimientos estandarizados y las acciones que garanticen el buen desarrollo de los análisis en una forma ordenada.

9. ¿Qué ventajas y/o desventajas ha presentado el laboratorio desde que cuenta con el manual de procedimientos?

| | |
|----|--|
| L1 | Ventajas: Establecer el procedimiento, Disminución de fallas y el personal debidamente entrenado puede realizar fácilmente el mismo análisis al tener el manual a la mano. Desventajas: No ha presentado. |
| L2 | Ventajas: Trazabilidad en el ensayo. Desventajas: no ha presentado. |

El manual de procedimientos es una herramienta de apoyo que le sirve al personal debidamente entrenado para agilizar la ejecución de los análisis, obteniendo resultados fiables; disminuyendo los errores a lo largo del procedimiento.

10. ¿Considera que se tiene un mejor desempeño y agilización en la realización de los análisis al contar con el apoyo de un manual de procedimiento?

| | |
|----|-----|
| L1 | Sí. |
| L2 | Sí. |

El manual de procedimiento ayuda a trabajar en una forma ordenada, evitando pasos innecesarios que conllevan a pérdida de tiempo y recursos.

11. ¿Tiene el personal de laboratorio fácil acceso a los manuales, instrucciones de trabajo, reglamentos y procedimientos de ensayo cuando tiene la necesidad de éstos?

| | |
|----|-----|
| L1 | Sí. |
| L2 | Sí. |

El personal del laboratorio encargado de realizar análisis tiene que tener la total disposición de los manuales; cuantas veces sea requerido por este, para la ejecución de los análisis u otra actividad relacionada con la garantía de la calidad.

**5.2 PROPUESTA DE MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS
DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NO
ESTÉRILES**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRUEBAS DE
LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NO
ESTERILES

ELABORADO POR:

REVISADO POR:

AUTORIZADO POR:

OCTUBRE DE 2008

SAN SALVADOR, EL SALVADOR

INDICE

| | |
|--|-----|
| Introducción | 46 |
| Objetivo | 46 |
| Alcance | 46 |
| Responsabilidad | 47 |
| Procedimientos normalizados de análisis | |
| Prueba preparatoria | 48 |
| Pruebas de límites microbianos en medicamentos no estériles: | |
| 1. Para muestras sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente. | 59 |
| 1.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 1.1.1 Método en placa | 60 |
| 1.1.2 Método tubos múltiples | 69 |
| 1.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 78 |
| 1.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 87 |
| 1.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 99 |
| 1.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 108 |
| 1.6 Recuento total de hongos | 117 |

| | |
|---|-----|
| 2. Para muestras líquidas en solución o suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico con menos del 30% y sólidos de disolución fácil. | 125 |
| 2.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 2.1.1 Método en placa | 126 |
| 2.1.2 Método tubos múltiples | 135 |
| 2.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 143 |
| 2.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 152 |
| 2.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 163 |
| 2.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 172 |
| 2.6 Recuento total de hongos | 180 |
| 3. Para muestras de ceras, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua. | 188 |
| 3.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 3.1.1 Método en placa | 189 |
| 3.1.2 Método tubos múltiples | 199 |
| 3.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 209 |
| 3.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 219 |
| 3.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 231 |
| 3.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 242 |
| 3.6 Recuento total de hongos | 252 |

| | |
|---|-----|
| 4. Para muestras líquidas en forma de aerosol | 261 |
| 4.1 Recuento total de microorganismos aerobios | |
| 4.1.1 Método en placa | 262 |
| 4.1.2 Método tubos múltiples | 272 |
| 4.2 Prueba de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | 282 |
| 4.3 Prueba de ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 293 |
| 4.4 Prueba de ausencia de <i>Salmonella spp</i> | 306 |
| 4.5 Prueba de ausencia de <i>Escherichia coli</i> | 317 |
| 4.6 Recuento total de hongos | 328 |

INTRODUCCION

En el presente manual se detallan los procedimientos microbiológicos normalizados para el análisis de productos farmacéuticos no estériles contemplados en la farmacopea de los Estados Unidos USP 27. El manual comprende procedimientos para realizar Pruebas de Límites Microbianos.

OBJETIVO

Describir los procedimientos normalizados para las pruebas de límites microbianos a productos farmacéuticos no estériles.

ALCANCE

Este manual se aplica a todo laboratorio destinado al análisis microbiológico de productos farmacéuticos no estériles.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

Hongo: organismos protistas no fotosintéticos que se proliferan como una masa de filamentos ramificados entrelazados (hifas), que se conoce como micelio.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): expresa el número de colonias originales a partir de una célula, pares, cadenas o agrupaciones de células.

Número Más Probable (NMP): es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias.

D. POLITICAS

- 1) Los análisis se realizaran de acuerdo a los procedimientos establecidos en este manual y por personal calificado.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada.

RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del personal de laboratorio seguir las normas establecidas y ejecutar los procedimientos en forma adecuada.

REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|---------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 1 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la prueba preparatoria realizada a los productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para todas las muestras de productos farmacéuticos no estériles.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presenta en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C. La gran mayoría de los microorganismos son mesófilos, incluidos los patógenos.

Microorganismos Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 3 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La validez de los resultados de las pruebas de límites microbianos que se describen en este manual depende, en gran medida de que pueda demostrarse que la muestra por si sola no inhibe la multiplicación bajo las condiciones de prueba que están presentes los microorganismos. Para demostrarlo se inoculan cultivos viables de ***Staphylococcus aureus***, ***Escherichia coli***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Salmonella*** por separado. Esto se logra agregando diluciones

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 4 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

de no menos de 10^{-3} en un caldo de cultivo con los microorganismos en los medios con la muestra a prueba.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Botella de Roux
- b) Erlenmeyer
- c) Espectrofotómetro
- d) Pipeta de 10 mL estéril
- e) Pipetas de 1 mL estéril
- f) perlas de ebullición
- g) Incubadora
- h) Tubos de ensayo

Medios y Reactivos

- a) Agar nutritivo
- b) Caldo Lactosado
- c) Caldo Casoy
- d) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

Estandarización del microorganismo de prueba

- 1) Sembrar microorganismo de Prueba en Agar inclinado e incubar a 37 °C por 24 h.
- 2) Adicionar de 2-3 mL de de solución salina estéril y perlas de ebullición para arrastrar el medio de cultivo de la superficie.
- 3) La suspensión que se obtiene se agrega a una botella de Roux que contiene 200 mL de Agar nutritivo, esparcir la suspensión sobre la superficie del medio e incubar a 35-37 °C por 24 h.
- 4) Adicionar 15 mL de solución salina estéril y 3-4 perlas de ebullición y arrastrar el cultivo de la superficie.
- 5) Pasar la solución a un Erlenmeyer y estandarizar el microorganismo en espectrofotómetro a una $\lambda=580$ nm.
- 6) Llevar blanco (solución salina estéril) a 100% de Tramitancia (T).
- 7) Tomar 0.1 mL de la suspensión con el microorganismo a un tubo que contenga 9 mL de solución salina y leer en Spectronic a una $\lambda=580$ nm y llevar a una T de 25%.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 8) Diluir o concentrar la solución para obtener el 25% de T.
- 9) A esta suspensión estandarizada realizar diluciones hasta obtener una concentración 10^{-3} (1:1000) en buffer fosfato pH 7,2.
- 10) Tomar 1 mL de esta dilución 10^{-3} del inóculo y agregar a 3 tubos que contengan 9 mL de Caldo Lactosado o Caldo Casoy e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C.
- 11) Si no hay crecimiento realizar diluciones 10^{-4} , 10^{-5} para poder trabajar en Límites Microbianos:

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Las muestras de los productos farmacéuticos no estériles deben de presentar crecimiento de los microorganismos inoculados al menos en la dilución de 10^{-3} , de lo contrario, realizar más diluciones para poder trabajar con las pruebas de límites microbianos

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 7 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 4) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.
- 5) Utilizar cepas ATCC

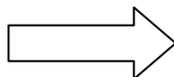
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 8 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

PRUEBA PREPARATORIA



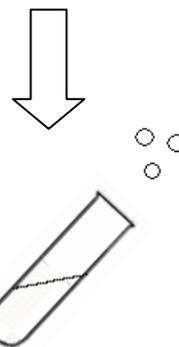
Sembrar microorganismo de Prueba en Agar inclinado



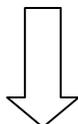
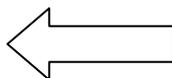
Incubar a 37 °C por 24 h.



La suspensión que se obtiene se agrega a una botella de Roux que contiene 200 mL de Agar nutritivo y esparcir la suspensión sobre la superficie del medio



Adicionar de 2-3 mL de de solución salina estéril y perlas de ebullición para arrastrar el medio de cultivo de la superficie.

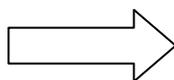


| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Salud por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 9 de 11 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

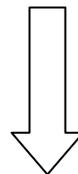
...continuación de Prueba Preparatoria.



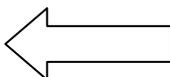
Incubar a 37 °C por 24 h.



Adicionar 15 mL de solución salina estéril y 3-4 perlas de ebullición y arrastrar el cultivo de la superficie.



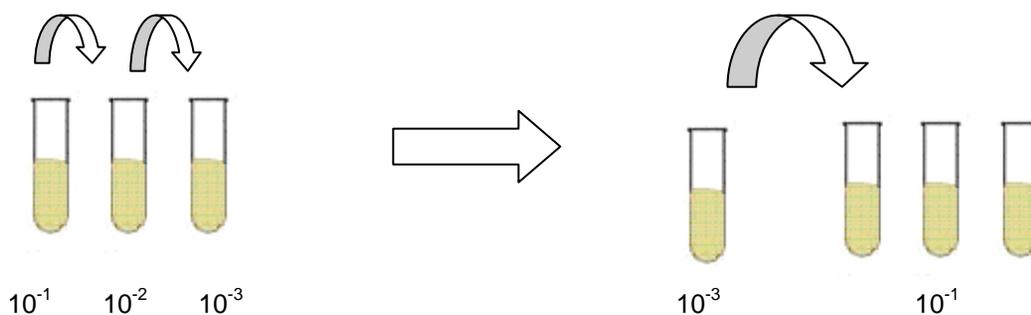
Diluir o concentrar la solución para obtener el 25% de T.



Pasar la solución a un Erlenmeyer y estandarizar el microorganismo en espectrofotómetro a una $\lambda=580$ nm. Llevar blanco (solución salina estéril) a 100% de Transmittancia (T).

| | | |
|---|--|-------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 10 de 11 |
| Elaborado por: | | Revisado por: |
| | | Autorizado por |

...continuación de Prueba Preparatoria.



A esta suspensión estandarizada realizar diluciones hasta obtener una concentración 1:1000 en buffer fosfato pH 7,2.

Tomar 1 mL de esta dilución (1:1000) del inoculo y agregar a 3 tubos que contengan 9 mL de Caldo Lactosado o Caldo Casoy e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C.



Si no hay crecimiento realizar diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} para poder trabajar en Límites Microbianos.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPP0001 |
| | Prueba Preparatoria en medicamentos no estériles | Página : 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica.

**PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS
NO ESTÉRILES (MUESTRAS SÓLIDAS QUE SE DISUELVEN EN GRAN
MEDIDA PERO NO TOTALMENTE).**

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

Microorganismos Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse ⁽¹⁰⁾.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): expresa el número de colonias originales a partir de una célula, pares, cadenas o agrupaciones de células.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaría y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El método utilizado para realizar el análisis de recuento total de bacterias aerobias mesófilas se llama placa vertida. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por la cual están incluidas en el término “Unidades Formadoras de Colonia (UFC)”.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri estéril
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias Québec
- h) Termómetro
- i) Frascos de dilución

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Digerido de Caseina y Soja

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo).
- 2) Agregar en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más si fuera necesario en diluciones decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 3) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C .
- 4) Cubrir las placas de petri
- 5) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Invertir las placas de petri e incubar durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- 7) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 8) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.
- 9) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra.

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIO DE ACEPTACION

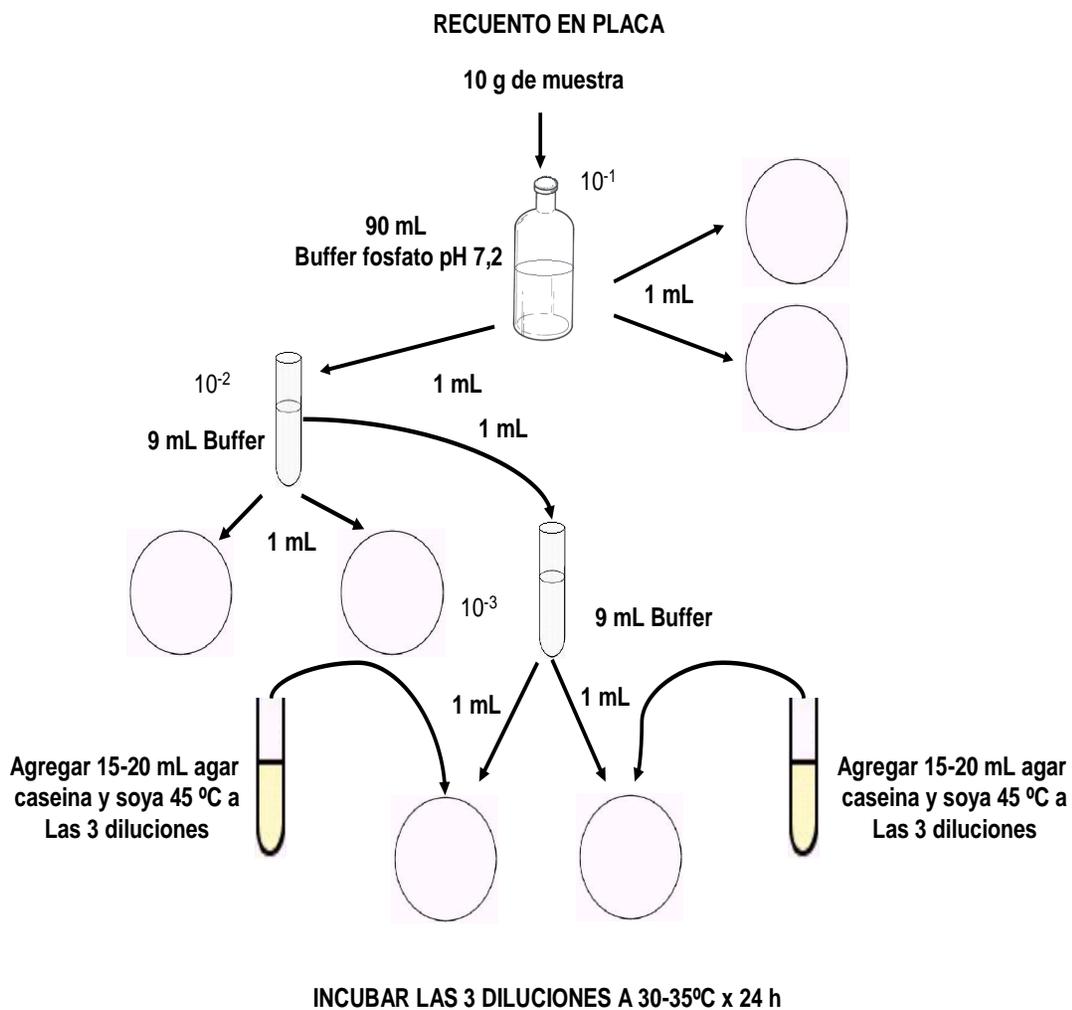
Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 8 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que no son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

Microorganismo Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Número Más Probable (NMP): es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Expone la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|---------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El recuento total de microorganismos aerobios por medio de la Técnica de los tubos múltiples consiste en la inoculación de diferentes volúmenes de muestra en una serie de tubos de ensayo que contienen caldo de cultivo nutritivo. Después de un período de incubación a una temperatura determinada se observa el crecimiento de los microorganismos por la turbidez del medio.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) 14 tubos de ensayo
- b) Pipeta de 1 mL estéril
- c) Pipeta de 10 mL estéril
- d) Balanza
- e) Incubadora

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseína y Soja

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar exactamente 10 g de muestra previamente pulverizada y disolver o suspender en Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7,2, Medio líquido de Caseína y Soja, o Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de soya-Polisorbato 20 para obtener 100 mL.
- 2) En cada uno de 14 tubos de ensayo de tamaño similar, colocar 9 mL de Medio Líquido Digerido de Caseína y Soja estéril.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Distribuir 12 tubos en cuatro grupos de 3 tubos cada uno.
- 4) Separar un grupo de 3 tubos para utilizarlos como control.
- 5) Pipetear 1 mL de la solución o suspensión de la muestra y transferir a cada uno de los tres tubos de un grupo (“100”) y a un cuarto tubo A, y mezclar.
- 6) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir al tubo restante B, no incluido en un grupo y mezclar (estos tubos contienen 100mg ó 100µL y 10mg ó 10µL de la muestra respectivamente).
- 7) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos del segundo grupo (“10”).
- 8) Pipetear 1 mL del tubo B y transferir a cada uno de los tres tubos del tercer grupo (“1”).
- 9) Desechar el contenido no utilizado de los tubos A y B.
- 10) Cerrar bien e incubar todos los tubos a una temperatura de 30 a 35°C por 48 a 72 h.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

11) Una vez transcurrido el tiempo de inoculación examinar los tubos para verificar el crecimiento de los microorganismos; los tres tubos control se mantienen transparente y los resultados observados en los tubos que contienen la muestra interpretarlos según la tabla (ver anexo) indican el Número Más Probable por g ó por mL de muestra.

IV. CALCULOS

Los resultados observados en los tubos que contienen las muestras, interpretarlos según tabla (ver anexo).

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Los tubos no deben de presentar turbidez. De presentar turbidez descodificar el código de los set de tubos según la tabla (ver anexo) y expresar los resultados como el Número de microorganismos por g ó por mL de muestra.

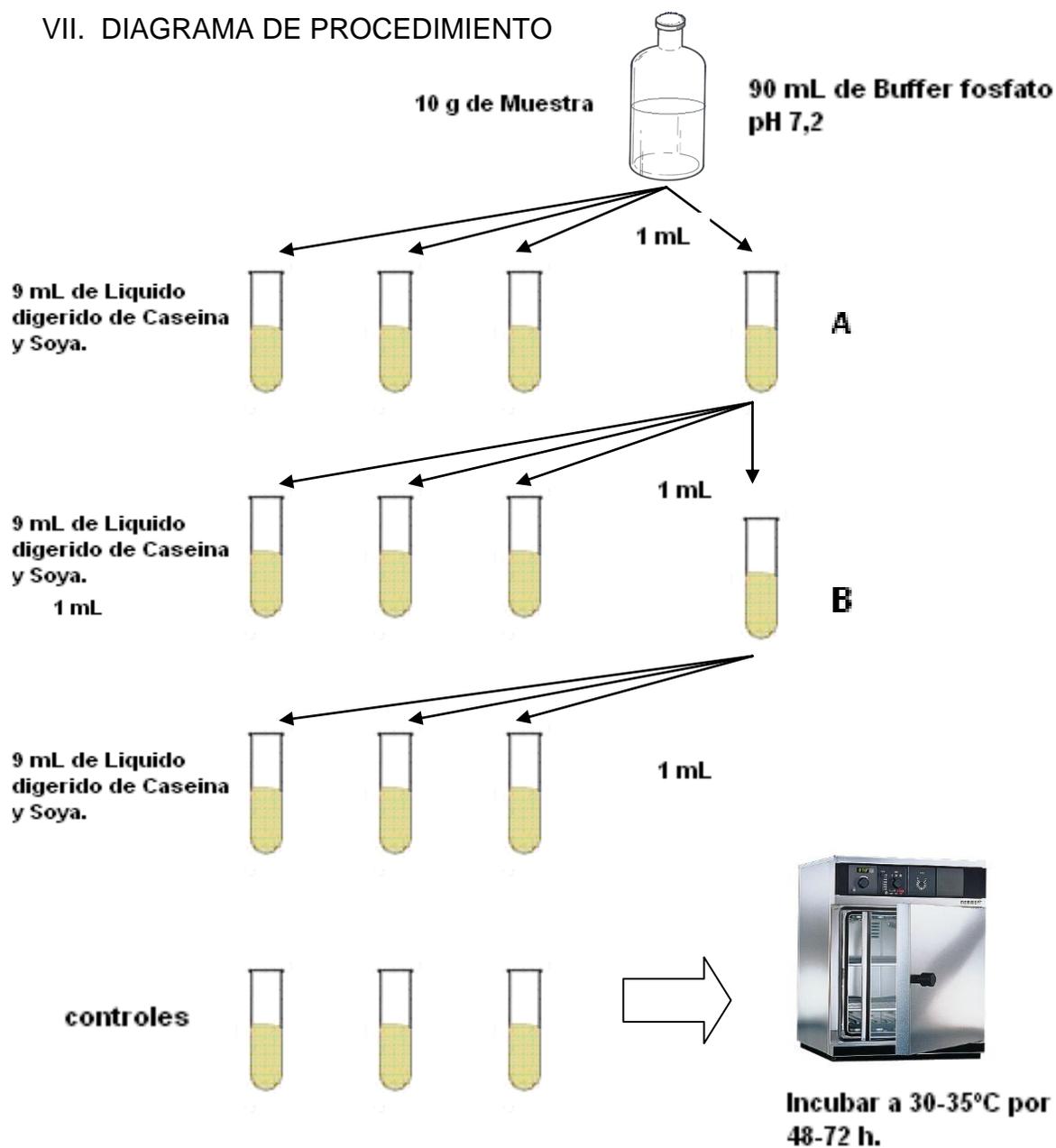
| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 8 de 9 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTT0002 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Recuento Total Más Probable por el Método en Tubos Múltiples.

| Combinaciones Observadas de Números de Tubos que evidencian crecimiento en cada grupo | | | Número Más Probable de Microorganismos por g ó por mL. |
|---|--------------|------------|--|
| Nº de mg (o mL) de muestra por tubo | | | |
| 100 (100µL) | 10 (10µL) | 1 (1µL) | |
| 3 | 3 | 3 | <1100 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 3 | 3 | 1 | 500 |
| 3 | 3 | 0 | 200 |
| 3 | 2 | 3 | 290 |
| 3 | 2 | 2 | 210 |
| 3 | 2 | 1 | 150 |
| 3 | 2 | 0 | 90 |
| 3 | 1 | 3 | 160 |
| 3 | 1 | 2 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 70 |
| 3 | 1 | 0 | 40 |
| 3 | 0 | 3 | 95 |
| 3 | 0 | 2 | 60 |
| 3 | 0 | 1 | 40 |
| 3 | 0 | 0 | 23 |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Anaerobio facultativo: que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El ***Staphylococcus aureus*** es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel y fosas nasales del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad. Por ser una bacteria de la flora normal de la piel esta constituye un riesgo de contaminación en la fabricación de los medicamentos. El ***Staphylococcus aureus*** es coagulasa positivo, lo cual constituye su característica más distintiva.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Mortero y pistilo
- e) Tubos de ensayo
- f) Balanza
- g) Incubadora

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya
- c) Medio Agar Vogel-Johnson
- d) Medio Agar Baird-Parker
- e) Medio Agar Manitol Salado
- f) Plasma de mamífero de conejo o caballo

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo) y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado), cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 4) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE COAGULASA (para ***Staphylococcus aureus***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson(o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos individuales que contengan cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero preferiblemente de conejo o caballo, con o sin aditivos.
- 2) Incubar en un baño de agua a 37°C, examinando los tubos a las 3 h y sucesivamente a intervalos adecuados hasta las 24 h.
- 3) Realizar las pruebas de los controles negativos y positivos con las muestras desconocidas.
- 4) No debe de formar ningún grado de coagulación.

IV. CALCULOS

No aplica.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Si los tubos con plasma no presentan ningún grado de coagulación la muestra cumple con requisitos para confirmar la ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

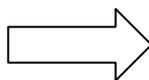
- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

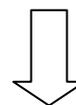
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



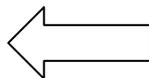
Pesar 10 g de muestra



Agregar Medio Líquido de Caseína y soya para obtener 100 mL.

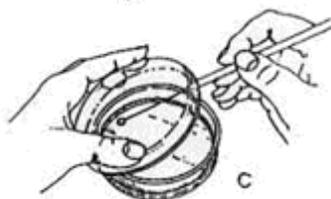
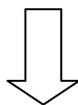


Medio con crecimiento de bacterias



Incubar a 30-35 °C durante 24 h.

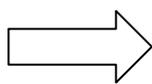
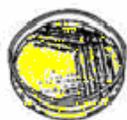
NOTA: Examinar el medio Líquido de Caseína y soya y ver si hay crecimiento, si lo hay seguir el procedimiento.



Sembrar en Medio Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado)

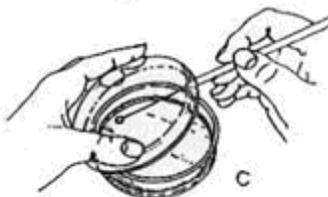
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 8 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Staphylococcus aureus***

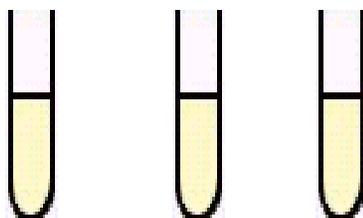
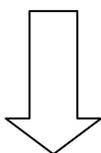


Tapar las placas, invertir e incubar a 30-35 °C durante 24h.

Prueba de Coagulasa (para ***Staphylococcus aureus***)



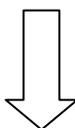
Transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos con 0.5 mL de plasma.



Tubos inoculados en 0.5 mL de plasma de conejo o caballo

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Staphylococcus aureus***



Incubar en baño de María a 37 °C y examinar los tubos a las 3 h y subsecuentemente a intervalos adecuados hasta las 24 h.

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Tinción Gram |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Medio Agar Vogel-johnson | Negro, rodeado de una zona amarilla | Cocos positivos (en grupos) |
| Medio Manitol Agar Salado | Colonias amarillas con zonas amarillas | Cocos positivos (en grupos) |
| Medo Agar Baird-Parker | Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5mm. | Cocos positivos (en grupos) |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 1 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

Luz UV: luz ultravioleta.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 2 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 3 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista para los humanos.

P. aeruginosa es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor a grapa *in vitro*. La identificación definitiva frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como su habilidad de crecer a 42 °C.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Mortero y pistilo
- e) Tubos de ensayo
- f) Balanza
- g) Lámpara de luz UV

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 4 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- h) Incubadora
- i) Baño de María
- j) Tiras o discos de papel filtro

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya
- c) Medio Agar Cetrimide
- d) Medio Agar Pseudomonas

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo) y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio Líquido Digerido de Caseína y Soya en la superficie del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 5 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 4) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA Y DE PIGMENTOS (*Pseudomonas aeruginosa*)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas representativas de la superficie del Medio Agar Cetrimide, sobre Agar ***Pseudomonas*** para las detecciones de fluorescencia y del Medio ***Pseudomonas*** para la detección de Píocianina contenidas en las cajas de petri.

NOTA: Debe de retransferirse un número grande de colonias sospechosas.

- 2) Dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.
- 3) Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a una temperatura de 35° ±2 °C durante no menos de tres días.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 6 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Examinar la superpie estriada bajo luz UV, para determinar si hay colonias presentes con las características mencionadas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA

Confirmar si el crecimiento de uno o más medios corresponde a ***Pseudomonas aeruginosa*** por medio de la prueba de oxidasa.

- 1) Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de ***Pseudomonas aeruginosa***, colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado previamente con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.
- 2) No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

La presencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** se puede confirmar mediante otros medios adecuados y pruebas bioquímicas, si fuera necesario.

IV. CALCULOS

No aplica

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 7 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Las colonias transferidas a los discos o tiras de papel filtro previamente impregnadas con diclorohidrato de N,N- Dimetil-p-Fenilendiamina no deben de presentar un color rosado que se torna a violeta, de lo contrario la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Pseudomonas***.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

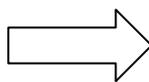
| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 8 de 12 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*



Pesar 10 g de muestra
previamente pulverizada



Agregar Medio Líquido de
Caseína y soya para obtener
100 mL.



NOTA: Examinar el medio y ver si
hay crecimiento, si lo hay seguir el
procedimiento.

Mezclar e Incubar de 30 a
35 °C durante 24 h.

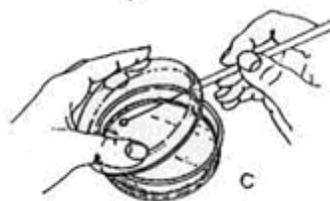
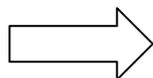


| | | |
|---|--|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 9 de 12 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.



Medio con crecimiento de bacterias



Realizar estrías en Medio Agar Cetrimide



Tapar las placas, invertir e Incubar de 30 a 35 °C por 24h.

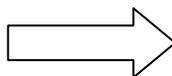
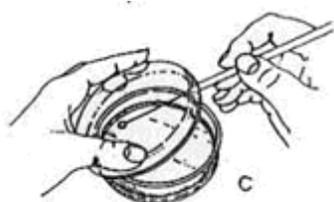


| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 10 de 12 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

Prueba de Oxidasa y de Pigmentos (Para determinar la ausencia de

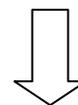
Pseudomonas aeruginosa)



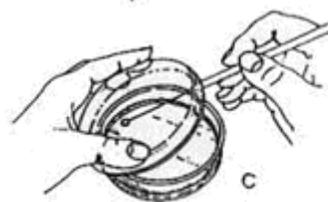
Transferir de las colonias sospechosas del Medio Agar Cetrimide a la superficie de Medio Agar *Pseudomonas* para la detección de fluorescina y pocianina contenidas en las placas de petri.

Tapar las placas, invertir e Incubar de $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por no menos de 3 días.

NOTA: Si se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir el medio de la placa en cuadrantes e inocular una colonia en cada uno de ellos.

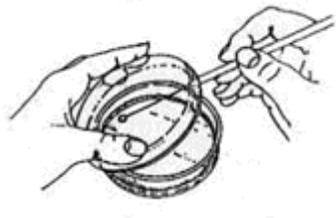


Examinar las placas bajo luz UV.

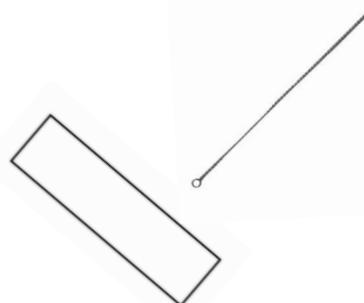
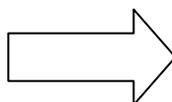


| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 11 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

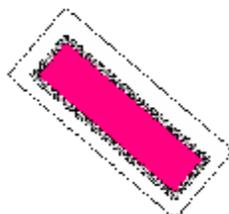
...continuación de Determinación de ***Pseudomonas aeruginosa***.



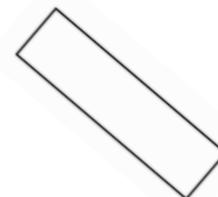
Crecimiento de ***Pseudomonas aeruginosa***



Transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.



(+)



(-)

No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 12 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo y de Diagnóstico.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Fluorescencia en luz UV | Prueba de Oxidasa | Tinción Gram |
|---|---|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Medio Agar Cetrimida | Generalmente verdoso | Verdoso | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de fluorescencia | Generalmente incoloro a amarillo | Amarillento | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de Píocianina | Generalmente verdoso | Azul | Positivo | Bacilos negativos |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Salmonella spp*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

TSI: Medio Agar Triple Azúcar-Hierro

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Expansión de la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Salmonella crece con facilidad en Agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología se aísla con medios selectivos, Selenito, SS o Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprófita.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Balanza
- c) Asa de inoculación
- d) Incubadora
- e) Mortero y pistilo
- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios y reactivos

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Líquido de Selenito-Cistina
- c) Medio Líquido de Tetratonato

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- d) Medio Agar Verde Brillante,
- e) Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- f) Medio Agar Sulfito de Bismuto

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo)
- 2) Suspenderlo en Medio Líquido Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 3) Examinar el medio para verificar el crecimiento,
- 4) Si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente. (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)

PRUEBA PARA ***Salmonella spp.***

- 1) Pipetear porciones de 1 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24 h.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Luego con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios Agar Selenito-Cistina y Tetrationato sobre la superficie de los Medio Agar Verde Brillante, Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y del Medio Agar Sulfito de Bismuto contenido en placas petri.
- 3) Tapar las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- 4) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia del género ***Salmonella***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
- 5) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI), estriando primero la superficie inclinada y luego clavar bien el alambre por debajo de la superficie.
- 6) Incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h
- 7) Examinar.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

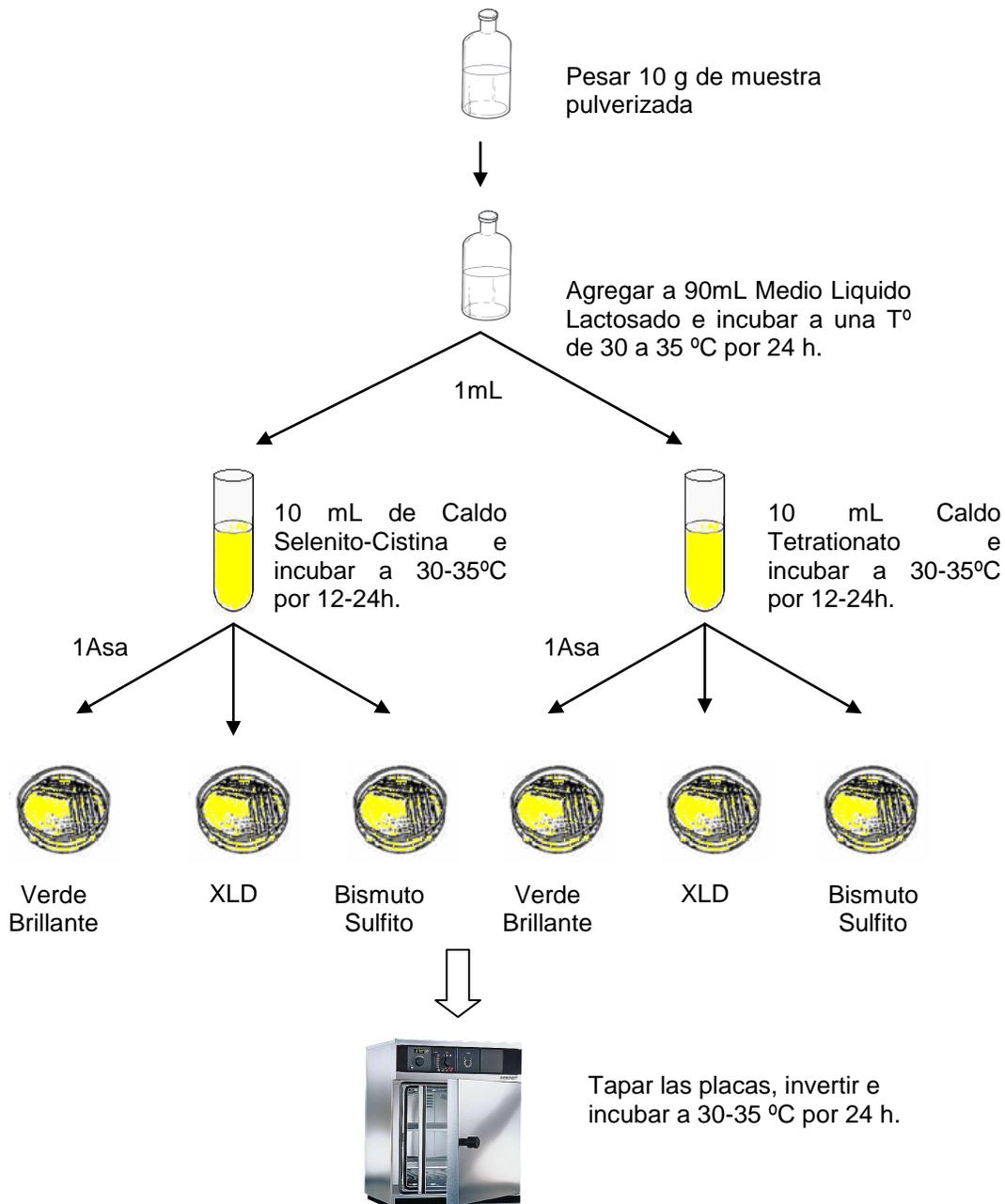
Ninguno de los tubos con medio Agar triple azúcar-hierro debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la Libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

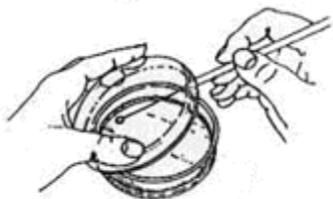
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



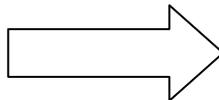
| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 8 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación prueba de *Salmonella spp*.

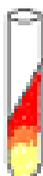
Si se encuentran colonias sospechosas proceder con identificación adicional



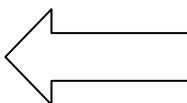
Transferir colonias sospechosas individualmente con la ayuda de un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro.



Estriar la superficie inclinada y luego clavar el alambre bien por debajo de la superficie



Examinar el tubo



Incubar a 30-35 °C por 24 h.
Examinar el tubo

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0002 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas **de *Salmonella spp*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias |
|---------------------------------------|--|
| Medio Agar Verde Brillante | Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo). |
| Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato | De color rojo, con o sin centros negros |
| Medio Agar con Sulfito de Bismuto | De color negro o verde |

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Pagina : 1 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que se disuelven en gran medida pero no totalmente.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

EMB: Agar Levine Eosina Azul de Metileno

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 3 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La prueba de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de medicamentos no estériles de presentación sólida comprende la inoculación de la muestra pulverizada en Medio Líquido de Lactosa, en la cual se comprueba el crecimiento de microorganismos coliformes Gram negativos; de ésta se toman pequeñas porciones con asa para inocular en Medio Agar McConkey y si presenta el crecimiento de colonias sospechosas, se realiza una prueba confirmativa de ***E. coli***, la cual consiste en resembrar las colonias sospechosas en Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Mortero y pistilo
- c) Balanza
- d) Asa de inoculación
- e) Incubadora

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios de cultivo

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Agar McConkey.
- c) Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo) y suspenderlo en Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento, el cual no debe de presentar turbidez. Si presenta turbidez, continuar con la prueba.
- 3) Mezclar el medio agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa).

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar McConkey.
- 5) Cubrir las placas de petri, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- 6) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
- 7) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a la superficie de Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno (EMB) colocado en cajas de petri.

NOTA: Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con colonia diferente.

- 8) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 9) Examinar las placas y ninguna de las colonias debe exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada ni presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida, si lo presentan la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra cumpla con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, ninguna de las placas con Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno debe de exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada y ninguna debe presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

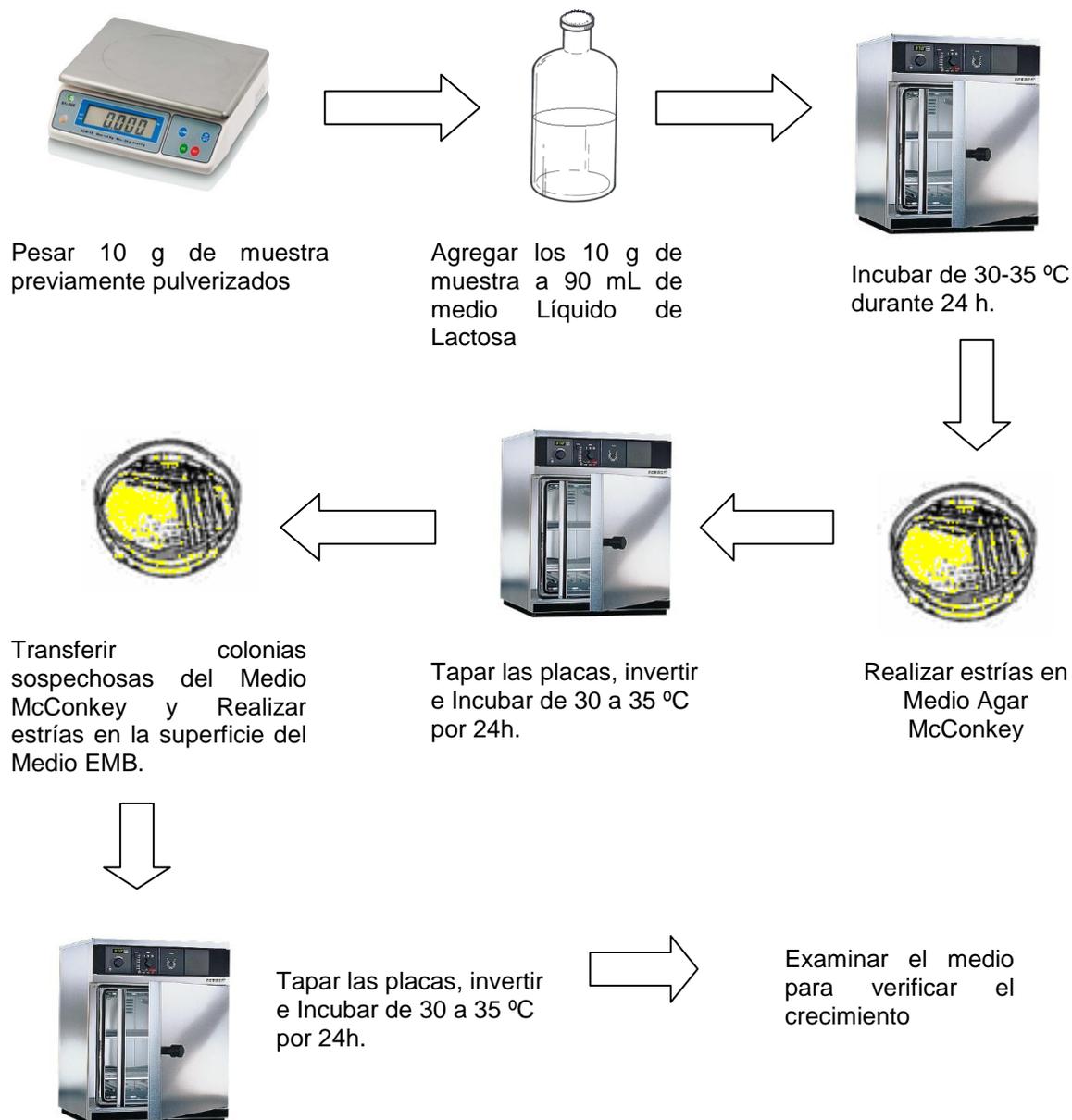
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 6) Utilizar la vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 7) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 8) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 9) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 10) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 8 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Escherichia coli*



| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0002 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Pagina : 9 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Escherichia coli*** en Medio Agar McConkey.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Tinción Gram | Morfología Característica de las Colonias |
| Bacilos negativos (cocos-bacilos) | De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor |

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 1 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de Hongos y Levaduras en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Hongo: organismos protistas no fotosintéticos que se proliferan como una masa de filamentos ramificados entrelazados (hifas), que se conoce como micelio.

Moho: Hongos con formas miceliales (hifas).

Levadura: célula mitótica sencilla oval o redonda, que no forman micelio y forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 2 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 3 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Los hongos son un grupo de diversos organismos unicelulares que se alimentan mediante la absorción directa de los nutrientes.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular.

Para el recuento se realizara el análisis por medio del método de placa vertida.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri
- e) Incubadora
- f) Cuenta colonias

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 4 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Sabouraud Dextrosa o Medio Agar Papa Dextrosa

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra previamente pulverizada en recipientes estériles (mortero y pistilo)
- 2) Suspender en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 3) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Papa Dextrosa o Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- 4) Cubrir las placas de petri
- 5) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 5 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Invertir las placas de petri e incubar durante 5 a 7 días a una temperatura de 20° a 25° C.
- 7) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 8) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL de muestra.
- 9) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra”.

IV. CALCULOS

No aplica

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 6 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

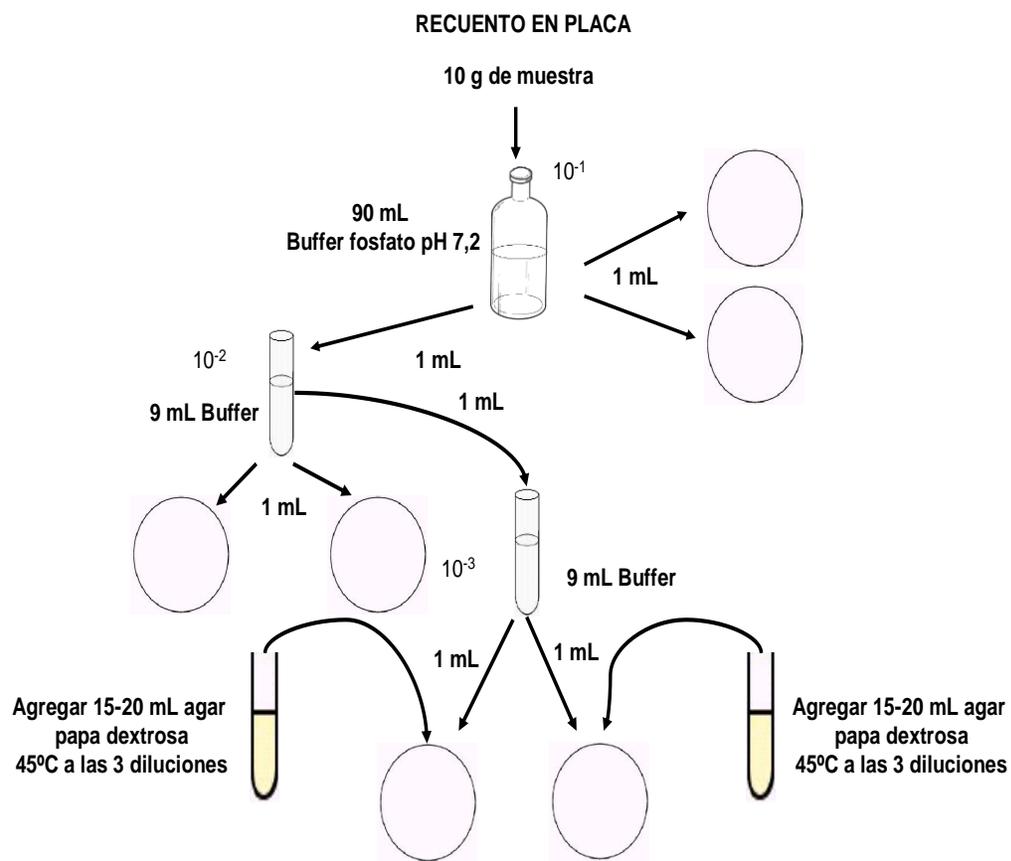
Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 7 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



INCUBAR LAS 3 DILUCIONES A 20-25°C x 5- 7días

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0002 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 9 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS.

No aplica.

**PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS
NO ESTÉRILES (MUESTRAS LÍQUIDAS EN SOLUCIÓN O SUSPENSIÓN EN
AGUA O UN VEHÍCULO HIDROALCOHÓLICO CON MENOS DEL 30% Y
SÓLIDOS DE DISOLUCIÓN FÁCIL).**

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

Microorganismos Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): expresa el número de colonias originales a partir de una célula, pares, cadenas o agrupaciones de células.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El método utilizado para realizar el análisis de recuento total de bacterias aerobias mesófilas se llama placa vertida. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por la cual están incluidas en el término “Unidades Formadoras de Colonia (UFC)”.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri estéril
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias Québec
- h) Termómetro
- i) Frascos de dilución

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Digerido de Caseina y Soja

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra.
- 2) Disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más si fuera necesario en diluciones decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 3) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C .
- 4) Cubrir las placas de petri
- 5) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- 6) Invertir las placas de petri e incubar durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C .

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 7) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 8) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.
- 9) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g o por mL de muestra.

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

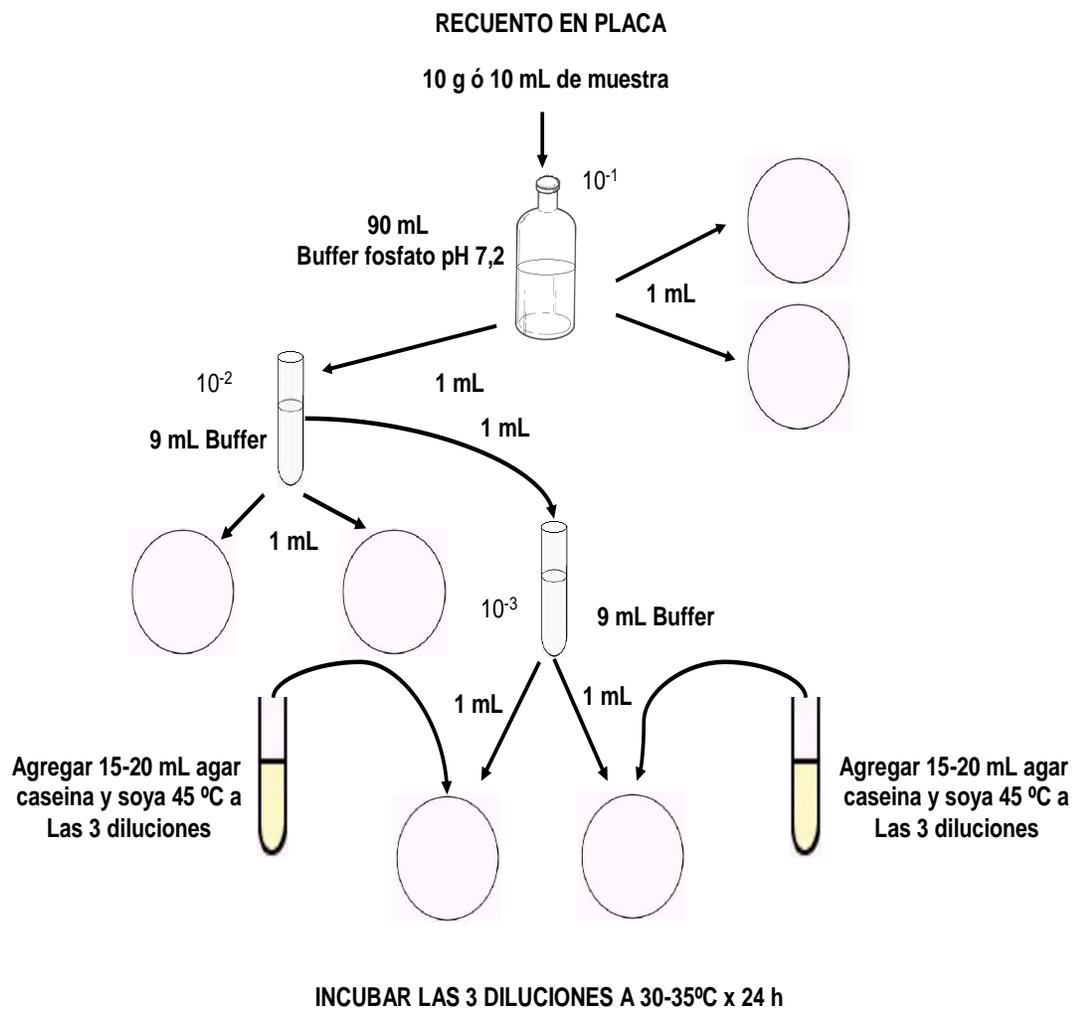
| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

| | | |
|---|---|---|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Pagina : 8 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página : 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica

| | | |
|--|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador <i>España la Unidad por la cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página : 1 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación sólidas que no son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C.

Microorganismo Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Número Más Probable (NMP): es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias.

| | | |
|---|--|------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Pagina : 2 de 8 |
| Elaborado por: | | Revisado por: |
| | | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página : 3 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|---------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El recuento total de microorganismos aerobios por medio de la Técnica de los tubos múltiples consiste en la inoculación de diferentes volúmenes de muestra en una serie de tubos de ensayo que contienen caldo de cultivo nutritivo. Después de un período de incubación a una temperatura determinada se observa el crecimiento de los microorganismos por la turbidez del medio.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página : 4 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) 14 tubos de ensayo
- b) Pipeta de 1 mL estéril
- c) Pipeta de 10 mL estéril
- d) Balanza

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soja

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra, disolver o suspender en Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7,2, Medio líquido de Caseina y Soja, o Medio Líquido de Digerido de Caseina-Lecitina de soya-Polisorbato 20 para obtener 100 mL.
- 2) En cada uno de 14 tubos de ensayo de tamaño similar, colocar 9 mL de Medio Líquido Digerido de Caseina y Soja estéril.
- 3) Distribuir 12 tubos en cuatro grupos de 3 tubos cada uno.
- 4) Separar un grupo de 3 tubos para utilizarlos como control.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página : 5 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 5) Pipetear 1 mL de la solución o suspensión de la muestra y transferir a cada uno de los tres tubos de un grupo (“100”) y a un cuarto tubo A, y mezclar.
- 6) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir al tubo restante B, no incluido en un grupo y mezclar (estos tubos contienen 100mg ó 100µL y 10mg ó 10µL de la muestra respectivamente).
- 7) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos del segundo grupo (“10”).
- 8) Pipetear 1 mL del tubo B y transferir a cada uno de los tres tubos del tercer grupo (“1”). Desechar el contenido no utilizado de los tubos A y B.
- 9) Cerrar bien e incubar todos los tubos a una temperatura de 30 a 35°C por 48 a 72 h.
- 10) Una vez transcurrido el tiempo de incubación examinar los tubos para verificar el crecimiento de los microorganismos; los tres tubos control se mantienen transparente y los resultados observados en los tubos que contienen la muestra, interpretarlos según la tabla (ver anexo) indican el Numero Más Probable (NMP) de microorganismos por g ó por mL.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página : 6 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

Los resultados observados en los tubos que contienen las muestras, interpretarlos según tabla (ver anexo).

V. CRITERIO DE ACEPTACION

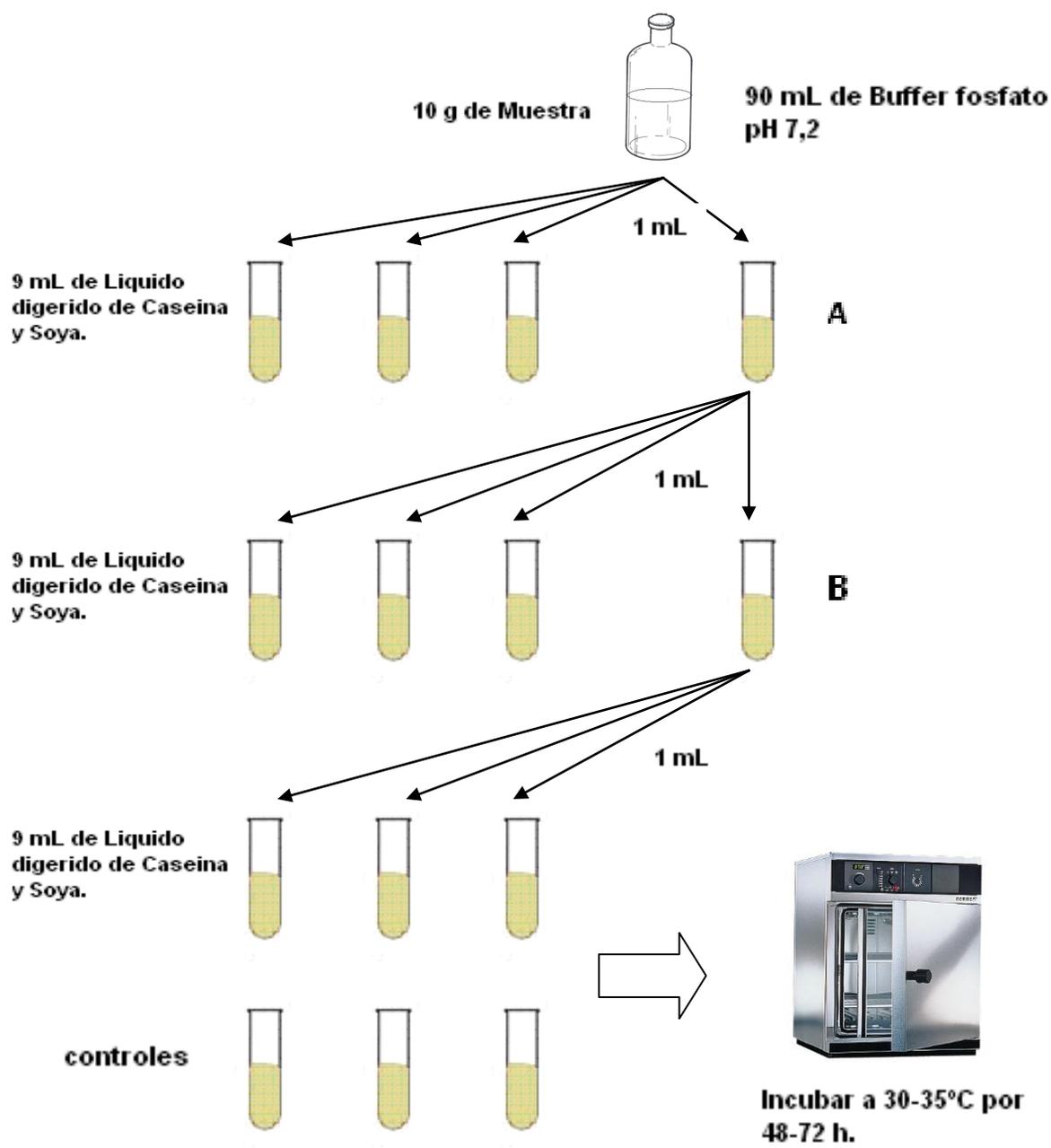
Los tubos no deben de presentar turbidez. De presentar turbidez descodificar el código de los set de tubos según la tabla (ver anexo) y expresar los resultados como el Número de microorganismos por g ó por mL de muestra.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Pagina : 7 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia de la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código:MRTBT0003 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Pagina : 8 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Recuento Total Más Probable por el Método en Tubos Múltiples.

| Combinaciones Observadas de Números de Tubos que evidencian crecimiento en cada grupo | | | Número Más Probable de Microorganismos por g ó por mL. |
|---|--------------|------------|--|
| Nº de mg (o mL) de muestra por tubo | | | |
| 100 (100µL) | 10 (10µL) | 1 (1µL) | |
| 3 | 3 | 3 | <1100 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 3 | 3 | 1 | 500 |
| 3 | 3 | 0 | 200 |
| 3 | 2 | 3 | 290 |
| 3 | 2 | 2 | 210 |
| 3 | 2 | 1 | 150 |
| 3 | 2 | 0 | 90 |
| 3 | 1 | 3 | 160 |
| 3 | 1 | 2 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 70 |
| 3 | 1 | 0 | 40 |
| 3 | 0 | 3 | 95 |
| 3 | 0 | 2 | 60 |
| 3 | 0 | 1 | 40 |
| 3 | 0 | 0 | 23 |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación líquida que consiste en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7,2 o en los medios especificados.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Anaerobio facultativo: que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El ***Staphylococcus aureus*** es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel y fosas nasales del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad. Por ser una bacteria de la flora normal de la piel esta constituye un riesgo de contaminación en la fabricación de los medicamentos. El ***Staphylococcus aureus*** es coagulasa positivo, lo cual constituye su característica más distintiva.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Mortero y pistilo
- e) Tubos de ensayo
- f) Balanza
- g) Incubadora

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Vogel-Johnson
- d) Medio Agar Baird-Parker
- e) Medio Agar Manitol Salado
- f) Plasma de mamífero de conejo o caballo

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson o (Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado), cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 4) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE COAGULASA (para ***Staphylococcus aureus***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson(o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos individuales que contengan cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero preferiblemente de conejo o caballo, con o sin aditivos.
- 2) Incubar en un baño de agua a 37°C, examinando los tubos a las 3 h y sucesivamente a intervalos adecuados hasta las 24 h.
- 3) Realizar las pruebas de los controles negativos y positivos con las muestras desconocidas.
- 4) No debe de formarse ningún grado de coagulación.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

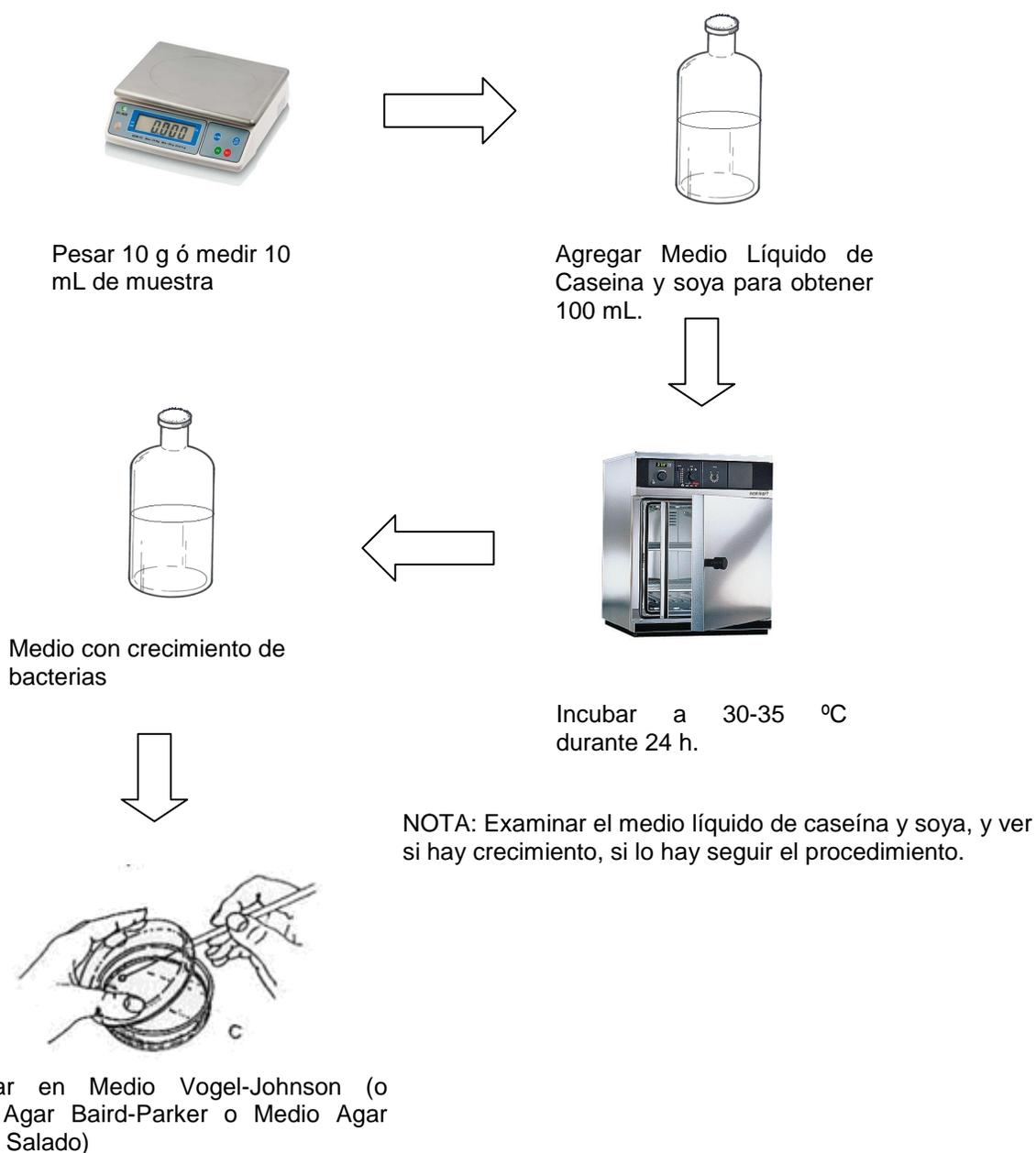
Si los tubos con plasma no presentan ningún grado de coagulación la muestra cumple con requisitos para confirmar la ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 11) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 12) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 13) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 14) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 15) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

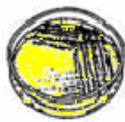
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 7 de 9 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



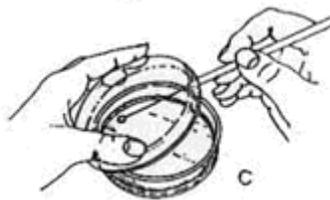
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 8 de 9 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Staphylococcus aureus***

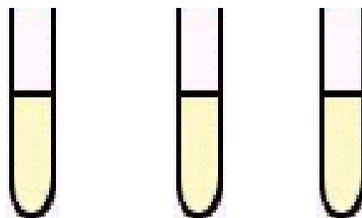
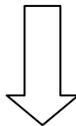


Tapar las placas, invertir e
incubar a 30-35 °C durante
24h.

Prueba de Coagulasa (para ***Staphylococcus aureus***)



Transferir colonias sospechosas de la
superficie del Medio Agar Vogel-
Johnson(o Medio Agar Baird-Parker o
Medio Agar Manitol Salado)
a tubos con 0.5 mL de plasma.



Tubos inoculados en 0.5 mL de
plasma de conejo o caballo

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0003 |
| | Determinación de ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Staphylococcus aureus***



Incubar en baño de María a 37 °C y examinar los tubos a las 3 h y subsecuentemente a intervalos adecuados hasta las 24 h.

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Tinción Gram |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Medio Agar Vogel-johnson | Negro, rodeado de una zona amarilla | Cocos positivos (en grupos) |
| Medio Manitol Agar Salado | Colonias amarillas con zonas amarillas | Cocos positivos (en grupos) |
| Medo Agar Baird-Parker | Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5mm. | Cocos positivos (en grupos) |

| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 1 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación líquida que consiste en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7,2 o en los medios especificados.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

Luz UV: luz ultra violeta

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 3 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista para los humanos.

P. aeruginosa es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor a grapa *in vitro*. La identificación definitiva frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como su habilidad de crecer a 42 °C.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Tubos de ensayo
- e) Balanza
- f) Lámpara de luz UV
- g) Incubadora

| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 4 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- h) Baño de Maria
- i) Tiras o discos de papel filtro.

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Cetrimide
- d) Medio Agar Pseudomonas

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra o medir 10 mL de la muestra líquida y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 4) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA Y DE PIGMENTOS (*Pseudomonas aeruginosa*)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas representativas de la superficie del Medio Agar Cetrimide, sobre Agar ***Pseudomonas*** para las detecciones de fluorescencia y del Medio ***Pseudomonas*** para la detección de Píocianina contenidas en las cajas de petri.

NOTA: Debe de retransferirse un número grande de colonias sospechosas.

- 2) Dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.
- 3) Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a una temperatura de 35° ±2 °C durante no menos de tres días.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Examinar la superficie estriada bajo luz UV, para determinar si hay colonias presentes con las características mencionadas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA

Confirmar si el crecimiento de uno o más medios corresponde a ***Pseudomonas aeruginosa*** por medio de la prueba de oxidasa.

- 1) Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de ***Pseudomonas aeruginosa***, colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado previamente con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.
- 2) No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

La presencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** se puede confirmar mediante otros medios adecuados y pruebas bioquímicas, si fuera necesario.

IV. CALCULOS

No aplica

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 7 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

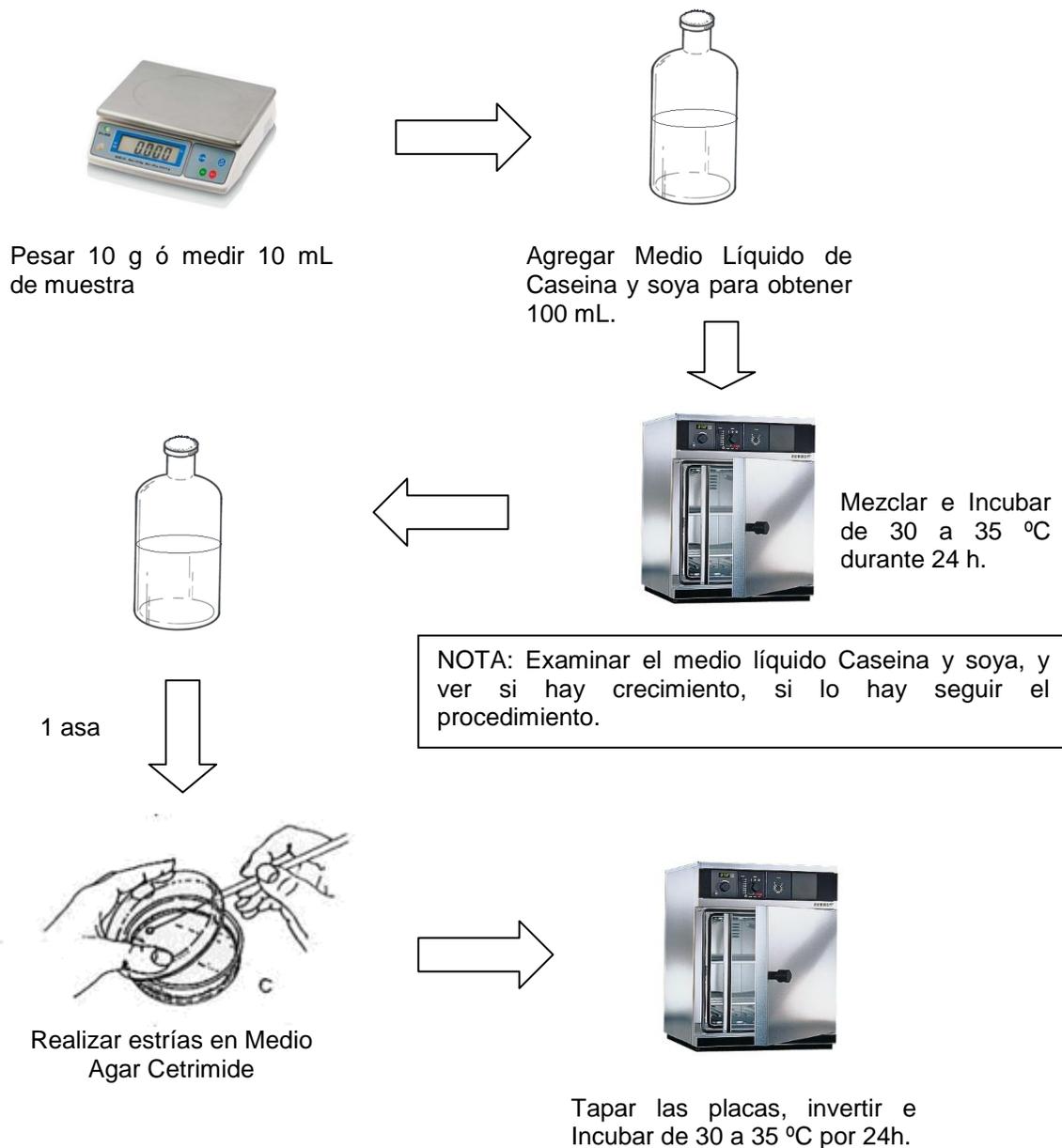
Las colonias transferidas a los discos o tiras de papel filtro previamente impregnadas con diclorohidrato de N,N- Dimetil-p-Fenilendiamina no deben de presentar un color rosado que se torna a violeta, de lo contrario la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Pseudomonas***.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 8 de 11 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

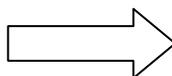
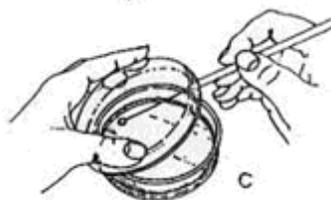


| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 9 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

Prueba de Oxidasa y de Pigmentos (Para determinar la ausencia de

Pseudomonas aeruginosa)



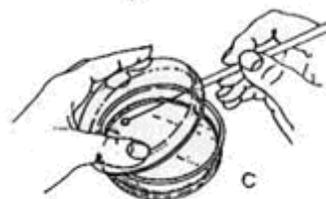
Transferir de las colonias sospechosas del Medio Agar Cetrimide a la superficie de Medio Agar *Pseudomonas* para la detección de fluorescina y pirocianina contenidas en las placas de petri.

Tapar las placas, invertir e Incubar de $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por no menos de 3 días.

NOTA: Si se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir el medio de la placa en cuadrantes e inocular una colonia en cada uno de ellos.

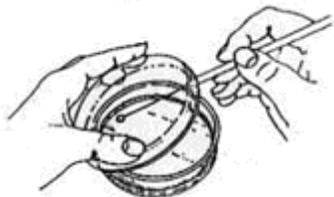


Examinar las placas bajo luz UV.

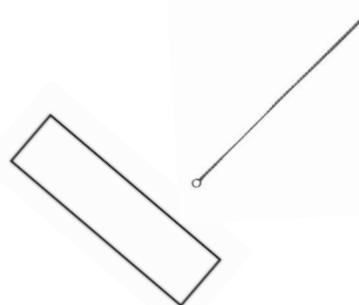
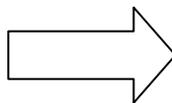


| | | |
|---|--|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 10 de 11 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

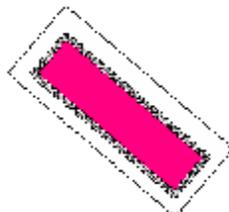
...continuación de Determinación de ***Pseudomonas aeruginosa***.



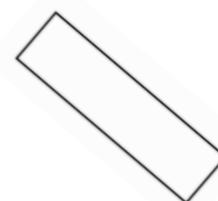
Crecimiento de ***Pseudomonas aeruginosa***



Transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.



(+)



(-)

No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo y de Diagnóstico.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Fluorescencia en luz UV | Prueba de Oxidasa | Tinción Gram |
|---|---|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Medio Agar Cetrimida | Generalmente verdoso | Verdoso | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de fluorescencia | Generalmente incoloro a amarillo | Amarillento | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de Píocianina | Generalmente verdoso | Azul | Positivo | Bacilos negativos |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 1 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Salmonella spp*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación líquida que consiste en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7,2 o en los medios especificados.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

TSI: Medio Agar Triple Azúcar-Hierro

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Unidad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Salmonella crece con facilidad en Agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología se aísla con medios selectivos, Selenito, SS o Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprófita.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Balanza
- c) Asa de inoculación
- d) Incubadora
- e) Mortero y pistilo
- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios y reactivos

- a) Medio Líquido de Lactosa

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Justicia</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- b) Medio Líquido de Selenito-Cistina
- c) Medio Líquido de Tetrionato
- d) Medio Agar Verde Brillante,
- e) Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- f) Medio Agar Sulfito de Bismuto

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra.
- 2) Suspenderlo en Medio Líquido Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 3) Examinar el medio para verificar el crecimiento,
- 4) Si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente. (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)

PRUEBA PARA ***Salmonella spp.***

- 1) Pipetear porciones de 1 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24 h.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Luego con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios Agar Selenito-Cistina y Tetrationato sobre la superficie de los Medio Agar Verde Brillante, Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y del Medio Agar Sulfito de Bismuto contenido en placas petri.
- 3) Tapar las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- 4) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia del género ***Salmonella***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
- 5) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI), estriando primero la superficie inclinada y luego clavar bien el alambre por debajo de la superficie.
- 6) Incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24. Examinar.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 6 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIO DE ACEPTACION

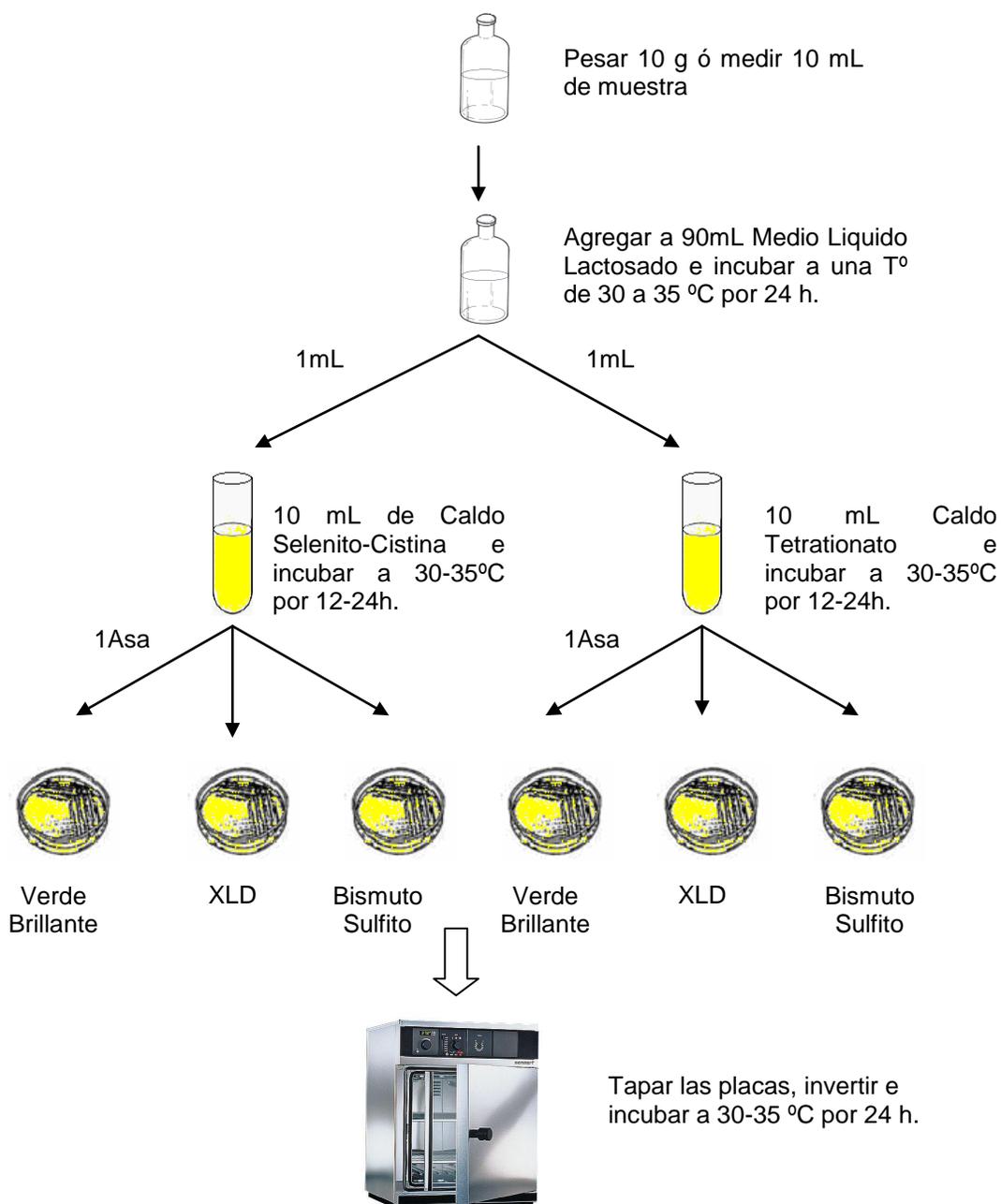
Ninguno de los tubos con medio Agar triple azúcar-hierro debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

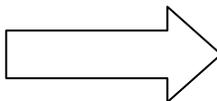
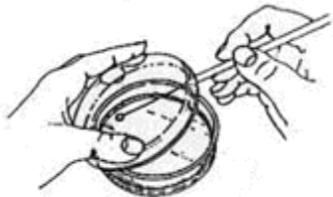
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 8 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

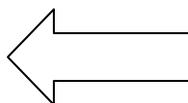
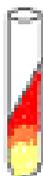
...continuación prueba de ausencia de ***Salmonella spp.***

Si se encuentran colonias sospechosas proceder con identificación adicional



Transferir colonias sospechosas individualmente con la ayuda de un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro.

Estriar la superficie inclinada y luego clavar el alambre bien por debajo de la superficie



Examinar el tubo

Incubar a 30-35 °C por 24 h.
Examinar el tubo

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0003 |
| | Determinación de Ausencia <i>Salmonella spp</i> | Página : 9 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Salmonella spp*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias |
|---------------------------------------|--|
| Medio Agar Verde Brillante | Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo). |
| Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato | De color rojo, con o sin centros negros |
| Medio Agar con Sulfito de Bismuto | De color negro o verde |

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>En busca de la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Pagina : 1 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación líquida que consiste en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7,2 o en los medios especificados.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

EMB: Agar Levine Eosina Azul de Metileno

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Pagina : 2 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 3 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La prueba de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de medicamentos no estériles comprende la inoculación de la muestra pulverizada en Medio Líquido de Lactosa, en la cual se comprueba el crecimiento de microorganismos coliformes Gram negativos; de ésta se toman pequeñas porciones con asa para inocular en Medio Agar McConkey y si presenta el crecimiento de colonias sospechosas, se realiza una prueba confirmativa de ***E. coli***, la cual consiste en resembrar las colonias sospechosas en Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Mortero y pistilo
- c) Balanza
- d) Asa de inoculación
- e) Incubadora

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 4 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios de cultivo

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Agar McConkey.
- c) Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar asépticamente 10 g de muestra ó medir 10 mL de la muestra líquida y suspenderlo en Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 24 h.
- 2) Examinar el medio para verificar el crecimiento, el cual no debe de presentar turbidez. Si presenta turbidez, continuar con la prueba.
- 3) Mezclar el medio agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)
- 4) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar McConkey.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 5 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 5) Cubrir las placas de petri, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
 - 6) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
 - 7) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a la superficie de Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno (EMB) colocado en cajas de petri.
- NOTA: Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con colonia diferente.
- 8) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
 - 9) Examinar las placas y ninguna de las colonias debe exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada ni presentar una apariencia

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 6 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

negro azulada bajo luz transmitida, si lo presentan la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra cumpla con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, ninguna de las placas con Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno debe de exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada y ninguna debe presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida.

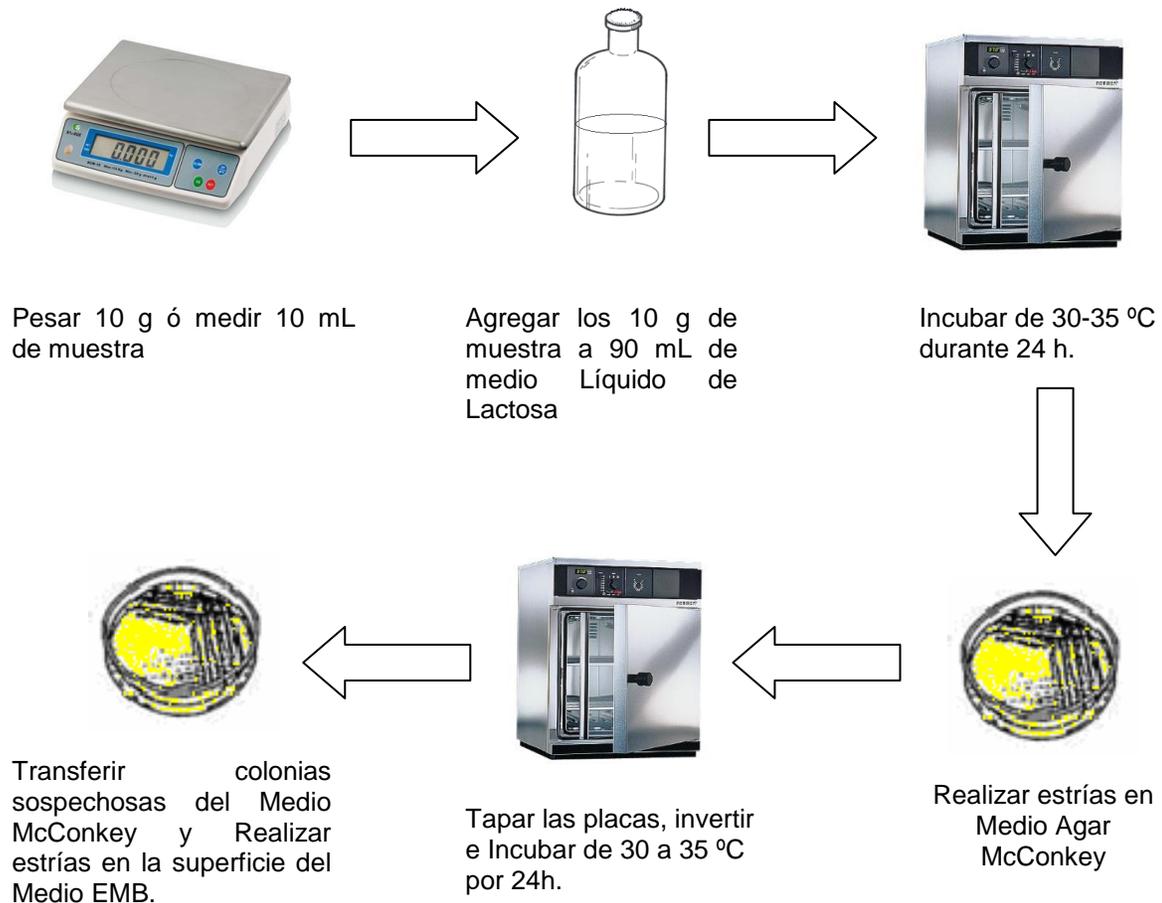
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.

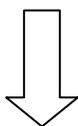
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 7 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

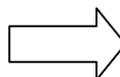
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0003 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 8 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |



Tapar las placas, invertir e Incubar de 30 a 35 °C por 24h.



Examinar el medio para verificar el crecimiento

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Escherichia coli*** en Medio Agar McConkey.

| Tinción Gram | Morfología Característica de las Colonias |
|-----------------------------------|--|
| Bacilos negativos (cocos-bacilos) | De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 1 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de Hongos y Levaduras en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Hongo: organismos protistas no fotosintéticos que se proliferan como una masa de filamentos ramificados entrelazados (hifas), que se conoce como micelio.

Moho: Hongos con formas miceliales (hifas).

Levadura: célula mitótica sencilla oval o redonda, que no forman micelio y forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 2 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 3 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Los hongos son un grupo de diversos organismos unicelulares que se alimentan mediante la absorción directa de los nutrientes.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular.

Para el recuento se realizara el análisis por medio del método de placa vertida.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias

| | | |
|--|--|---|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 4 de 8 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Sabouraud Dextrosa o Medio Agar Papa Dextrosa

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra en recipientes estériles.
- 2) Disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 3) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Papa Dextrosa o Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- 4) Cubrir las placas de petri
- 5) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 5 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Invertir las placas de petri e incubar durante 5-7 días.
- 7) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 8) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL de muestra.
- 9) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra”.

IV. CALCULOS

No aplica.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 6 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

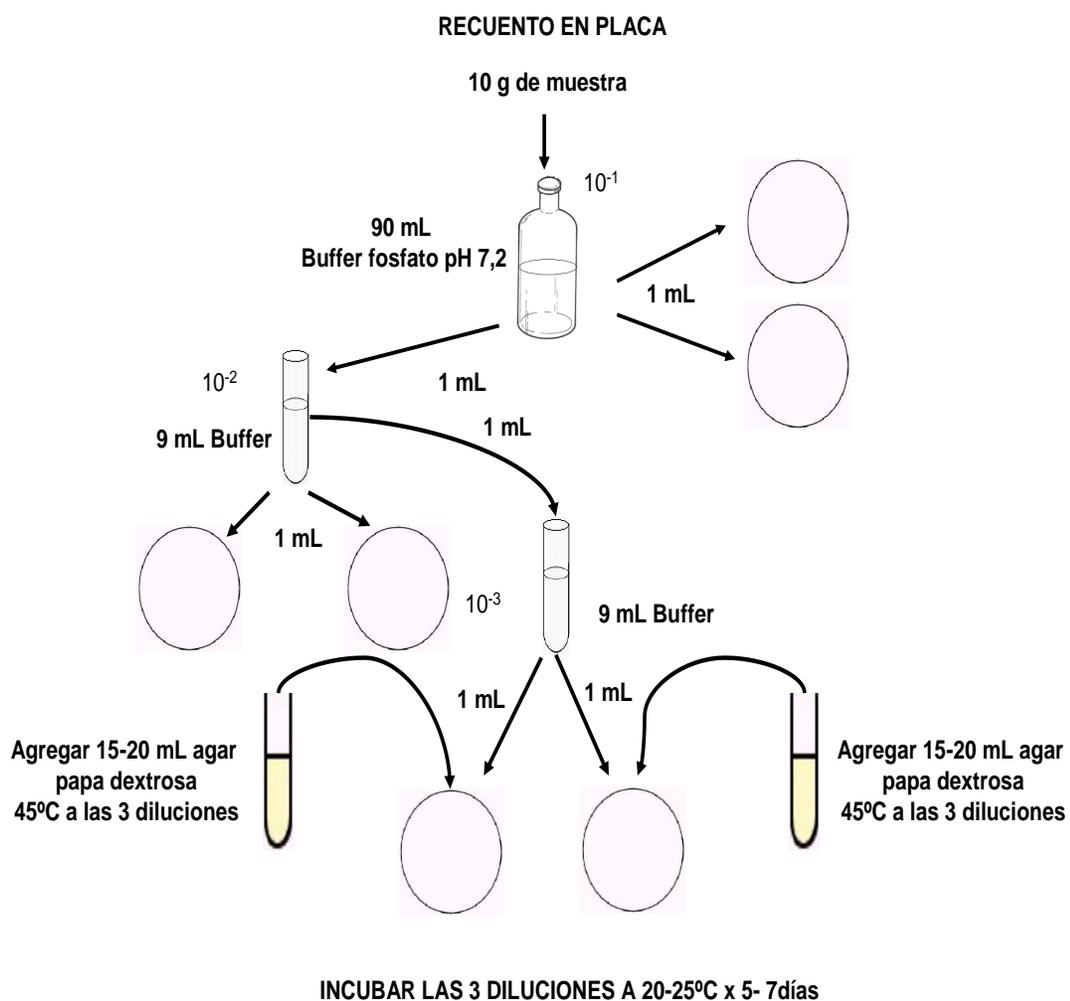
Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar papa dextrosa, no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 7 de 8 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0003 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página de: 8 de 8 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS.

No aplica.

**PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS
NO ESTÉRILES (MUESTRAS DE CERAS, CREMAS, UNGÜENTOS Y
LÍQUIDOS INMISCIBLES CON AGUA).**

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para Recuento Total de Microorganismos Aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estéril.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C. La gran mayoría de los microorganismos son mesófilos, incluidos los patógenos.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Microorganismos Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): expresa el número de colonias originales a partir de una célula, pares, cadenas o agrupaciones de células.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El método utilizado para realizar el análisis de recuento total de bacterias aerobias mesófilas se llama placa vertida. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por la cual están incluidas en el término “Unidades Formadoras de Colonia (UFC)”.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri estéril
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias Québec
- h) Termómetro
- i) Frascos de dilución

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Digerido de Caseina y Soja

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más si fuera necesario en diluciones decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 5) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- 6) Cubrir las placas de petri.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 7) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- 8) Invertir las placas de petri e incubar durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- 9) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 10) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.
- 11) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g o por mL de muestra.

| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 7 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

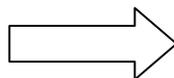
Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

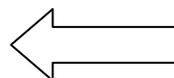
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 8 de 10 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO



Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).

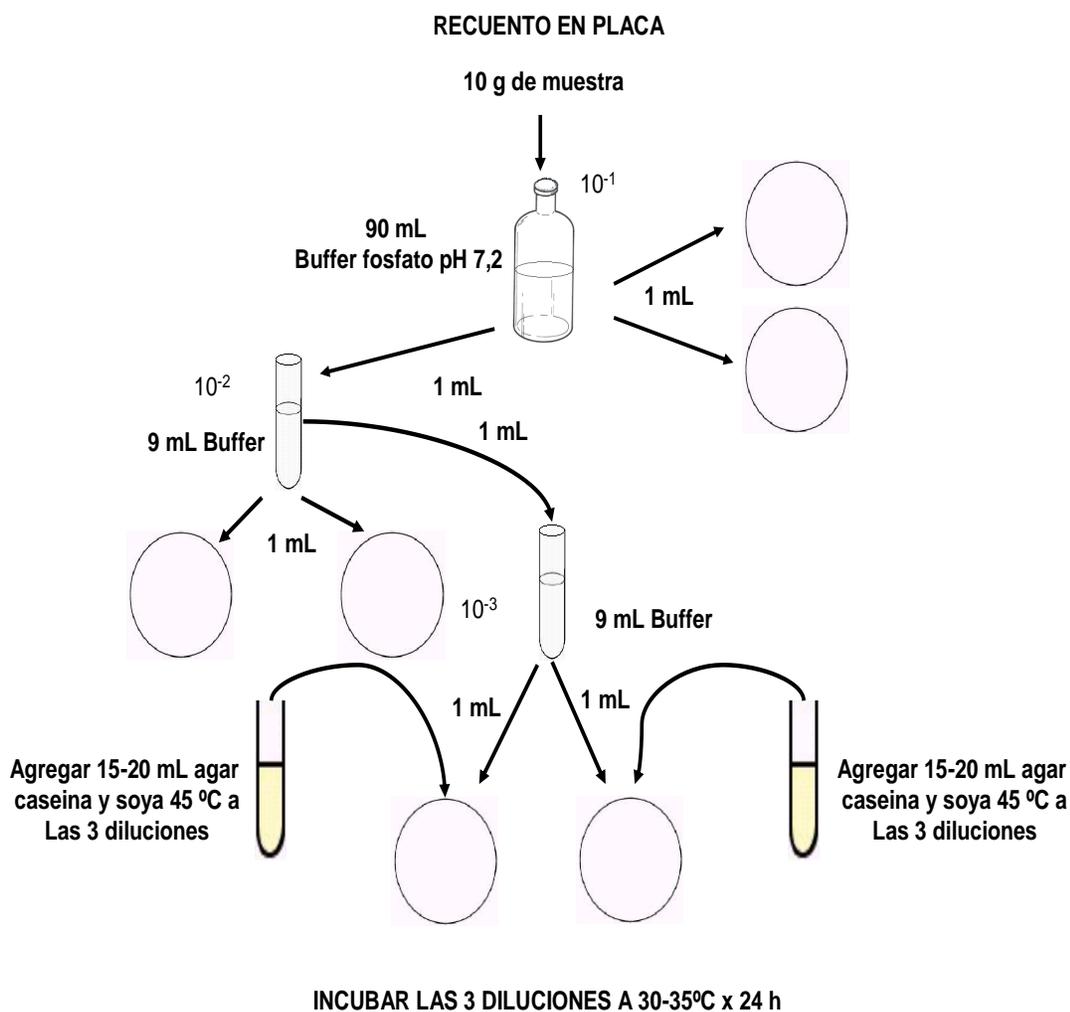
Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T° que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.



Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL de buffer fosfato pH 7,2 para obtener 100 mL.

Medir 10 mL de muestra

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |



| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 10 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para Recuento Total de Microorganismos Aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles que no son lo suficientemente solubles o translúcidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C. La gran mayoría de los microorganismos son mesófilos, incluidos los patógenos.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Microorganismo Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Número Más Probable (NMP): es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El recuento total de microorganismos aerobios por medio de la Técnica de los tubos múltiples consiste en la inoculación de diferentes volúmenes de muestra en una serie de tubos de ensayo que contienen caldo de cultivo nutritivo. Después de un período de incubación a una temperatura determinada se observa el crecimiento de los microorganismos por la turbidez del medio.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) 14 tubos de ensayo
- b) Pipeta de 1 mL estéril
- c) Pipeta de 10 mL estéril
- d) Balanza
- e) Incubadora

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseína y Soja

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y disolver o suspender en 90 mL de Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7,2, Medio líquido de

| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 5 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Caseína y Soya, o Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de soya-Polisorbato 20 para obtener 100 mL.

- 5) En cada uno de 14 tubos de ensayo de tamaño similar, colocar 9 mL de Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya estéril.
- 6) Distribuir 12 tubos en cuatro grupos de 3 tubos cada uno.
- 7) Separar un grupo de 3 tubos para utilizarlos como control.
- 8) Pipetear 1 mL de la solución o suspensión de la muestra y transferir a cada uno de los tres tubos de un grupo ("100") y a un cuarto tubo A, y mezclar.
- 9) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir al tubo restante B, no incluido en un grupo y mezclar (estos tubos contienen 100mg ó 100µL y 10mg ó 10µL de la muestra respectivamente).
- 10) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos del segundo grupo ("10") y pipetear 1 mL del tubo B y transferir a cada uno de los tres tubos del tercer grupo ("1").
- 11) Desechar el contenido no utilizado de los tubos A y B.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

12) Cerrar bien e incubar todos los tubos a una temperatura de 30 a 35°C por 48-72 h.

13) Una vez transcurrido el tiempo de incubación examinar los tubos para verificar el crecimiento de los microorganismos; los tres tubos control se mantienen transparente y los resultados observados en los tubos que contienen la muestra, interpretarlos según la tabla (ver anexo) indican el Número Más Probable (NMP) de microorganismos por g ó por mL de muestra.

IV. CALCULOS

Los resultados observados en los tubos que contienen las muestras, interpretarlos según tabla (ver anexo).

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Los tubos que presentan turbidez se consideran como positivos y los que no presentan turbidez como negativos.

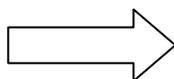
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 7 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

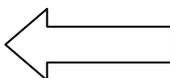
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 8 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).

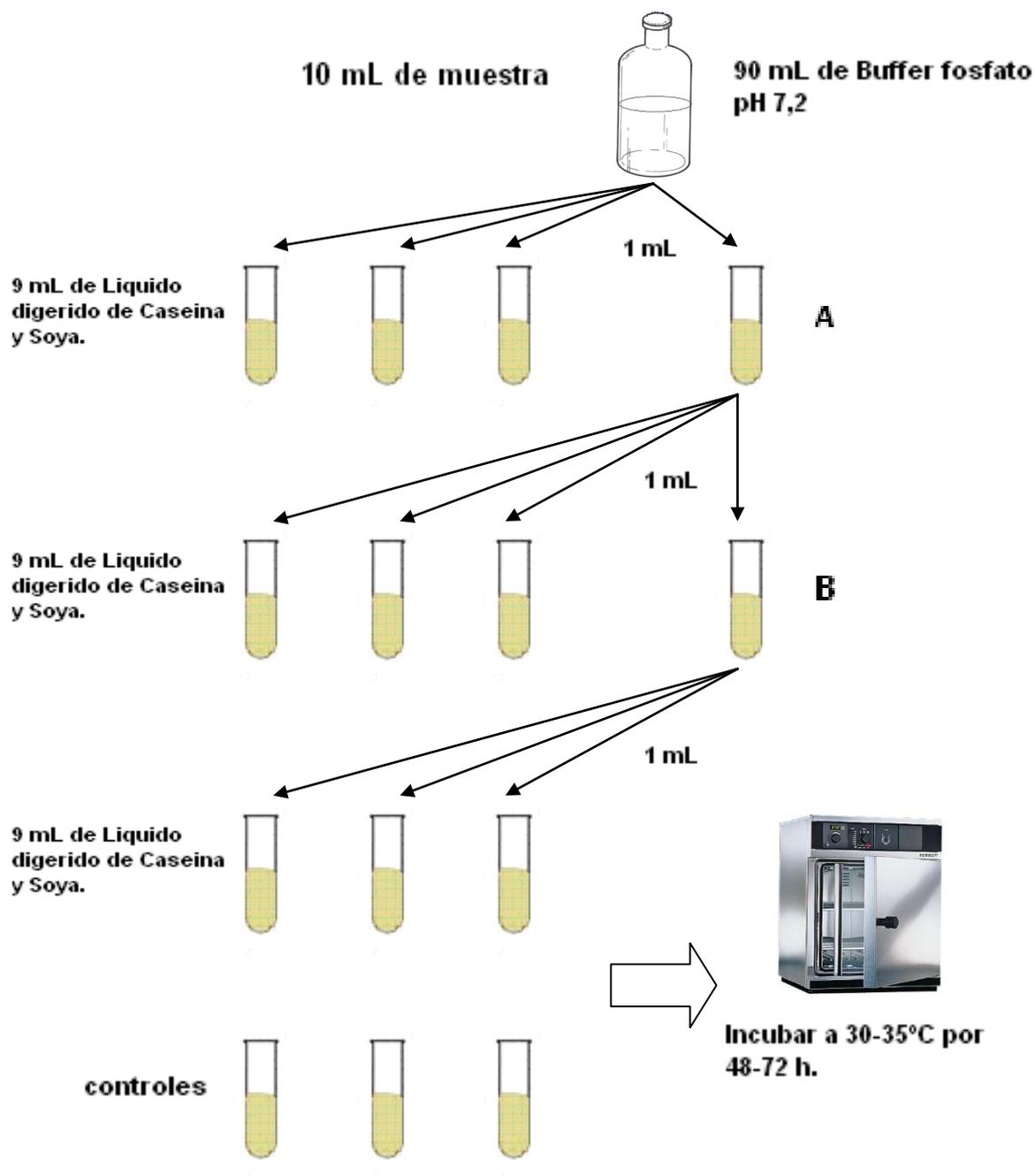
Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T° que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.



Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL de Buffer Fosfato pH 7,2 para obtener 100 mL.

Medir 10 mL de muestra

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por: |



| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBT0004 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 10 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Recuento Total Más Probable por el Método en Tubos Múltiples.

| Combinaciones Observadas de Números de Tubos que evidencian crecimiento en cada grupo | | | Número Más Probable de Microorganismos por g ó por mL. |
|---|--------------|------------|--|
| Nº de mg (o mL) de muestra por tubo | | | |
| 100 (100µL) | 10 (10µL) | 1 (1µL) | |
| 3 | 3 | 3 | <1100 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 3 | 3 | 1 | 500 |
| 3 | 3 | 0 | 200 |
| 3 | 2 | 3 | 290 |
| 3 | 2 | 2 | 210 |
| 3 | 2 | 1 | 150 |
| 3 | 2 | 0 | 90 |
| 3 | 1 | 3 | 160 |
| 3 | 1 | 2 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 70 |
| 3 | 1 | 0 | 40 |
| 3 | 0 | 3 | 95 |
| 3 | 0 | 2 | 60 |
| 3 | 0 | 1 | 40 |
| 3 | 0 | 0 | 23 |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en cera, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Anaerobio facultativo: que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 2 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El ***Staphylococcus aureus*** es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel y fosas nasales del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad. Por ser una bacteria de la flora normal de la piel esta constituye un riesgo de contaminación en la fabricación de los medicamentos.

S. aureus es coagulasa positivo, lo cual constituye su característica más distintiva.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Tubos de ensayo
- e) Balanza
- f) Lámpara de luz UV

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- g) Incubadora
- h) Baño de Maria
- i) Tiras o discos de papel filtro

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Vogel-Johnson
- d) Medio Agar Baird-Parker
- e) Medio Agar Manitol Salado

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 5) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Vogel-Johson o (Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado), cada uno de ellos colocados en placas petri.
- 6) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 7) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE COAGULASA (para ***Staphylococcus aureus***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos individuales que contengan cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero preferiblemente de conejo o caballo, con o sin aditivos.
- 2) Incubar en un baño de agua a 37°C, examinando los tubos a las 3 h y sucesivamente a intervalos adecuados hasta las 24 h.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

3) Realizar las pruebas de los controles negativos y positivos con las muestras desconocidas.

4) No debe de formar ningún grado de coagulación.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Si los tubos con plasma no presentan ningún grado de coagulación la muestra cumple con requisitos para confirmar la ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

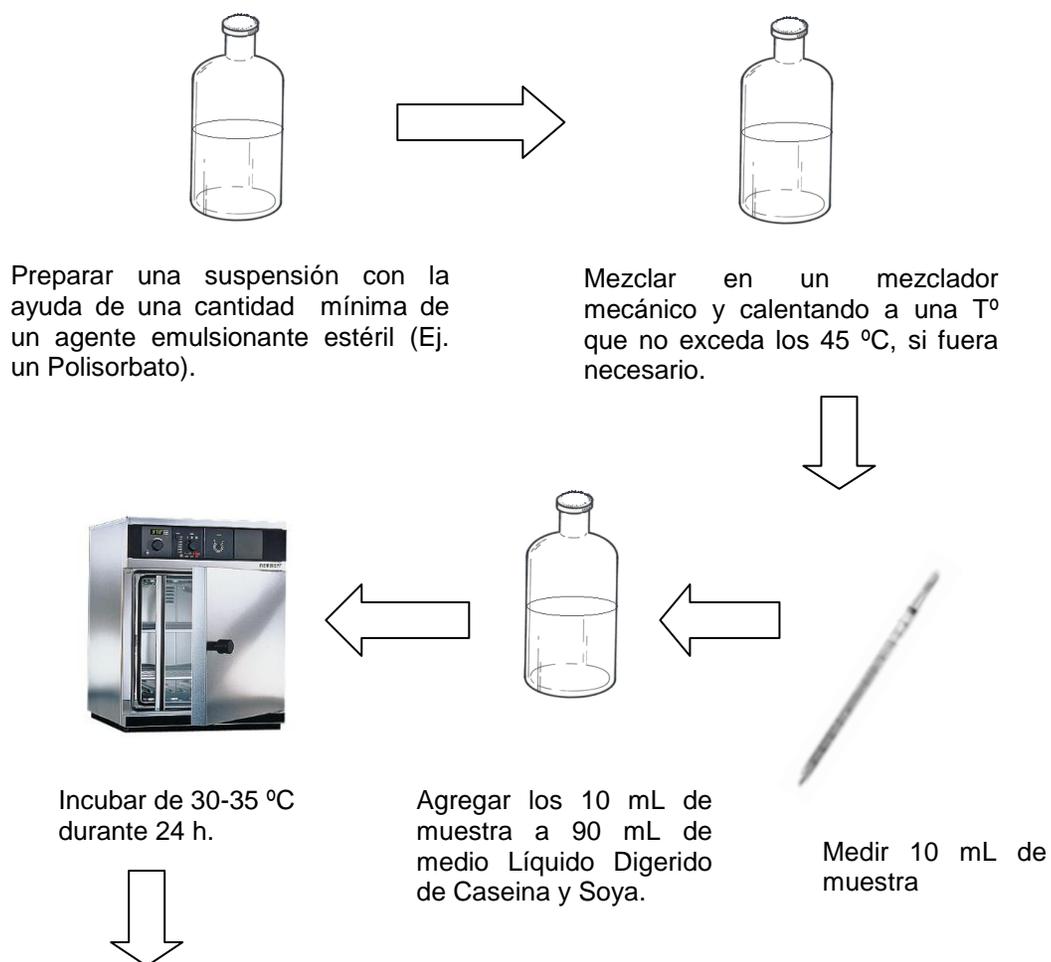
- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 7 de 10 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

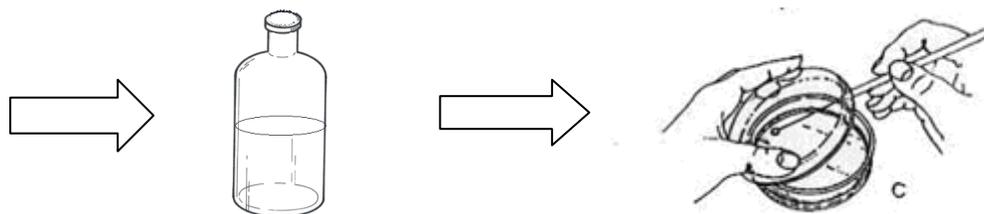
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Staphylococcus aureus*.



| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 8 de 10 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

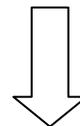
...continuación de prueba de Ausencia de ***Staphylococcus aureus***.



Medio con crecimiento de bacterias

Sembrar en Medio Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado)

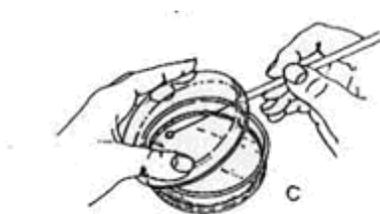
NOTA: Examinar el medio líquido de caseína y soya, ver si hay crecimiento, si lo hay seguir el procedimiento.



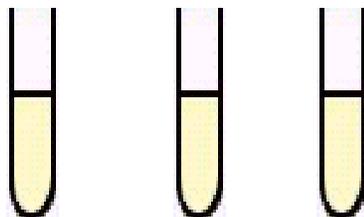
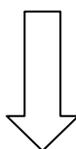
Tapar las placas, invertir e incubar a 30-35 °C durante 24h.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

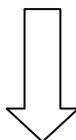
Prueba de Coagulasa (para *Staphylococcus aureus*)



Transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos con 0.5 mL de plasma.



Tubos inoculados en 0.5 mL de plasma de conejo o caballo



Incubar en baño de María a 37 °C y examinar los tubos a las 3 h y subsecuentemente a intervalos adecuados hasta las 24 h.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 10 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Tinción Gram |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Medio Agar Vogel-johnson | Negro, rodeado de una zona amarilla | Cocos positivos (en grupos) |
| Medio Manitol Agar Salado | Colonias amarillas con zonas amarillas | Cocos positivos (en grupos) |
| Medo Agar Baird-Parker | Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5mm. | Cocos positivos (en grupos) |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 1 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en cera, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

Luz UV: luz ultra violeta

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 2 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 3 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos.

Como otras ***Pseudomonas***, ***P. aeruginosa*** secreta una variedad de pigmentos como pircianina (azul verdoso) y fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente).

En medio Agar Pseudomona se evidencia claramente el desarrollo de estos pigmentos lo cual sirve de gran manera para su identificación.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Tubos de ensayo
- e) Balanza
- f) Lámpara de luz UV
- g) Incubadora
- h) Baño de Maria

| | | |
|--|--|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR UNIVERSITY OF EL SALVADOR Escuela de Ingeniería por la Calidad</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 4 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- i) Tiras o discos de papel filtro

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Cetrimide
- d) Medio Agar Pseudomonas

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y adicionar a 90 mL de Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 5) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador Escuela de Ingeniería y Tecnología</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 5 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 7) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA Y DE PIGMENTOS (para ***Pseudomonas aeruginosa***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas representativas de la superficie del Medio Agar Cetrimide, sobre Agar *Pseudomonas* para las detecciones de fluorescencia y del Medio *Pseudomonas* para la detección de Piocianina contenidas en las cajas de petri.

NOTA: Debe de retransferirse un número grande de colonias sospechosas

- 2) Dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.
- 3) Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante no menos de tres días.

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 6 de 12 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Examinar la superpie estriada bajo luz UV, para determinar si hay colonias presentes con las características mencionadas en la tabla (ver anexo).

PRUEBA DE OXIDASA

Confirmar si el crecimiento de uno o más medios corresponde a ***Pseudomonas aeruginosa*** por medio de la prueba de oxidasa.

- 1) Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de ***Pseudomonas aeruginosa***, colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que tenga impregnado previamente con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.
- 2) No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

La presencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** se puede confirmar mediante otros medios adecuados y pruebas bioquímicas con la prueba si es necesario.

IV. CALCULOS

No aplica.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FUNDADA EN 1968 UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR Escuela de Libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 7 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Las colonias transferidas a los discos o tiras de papel filtro previamente impregnadas con Diclorohidrato de N,N- Dimetil-p-Fenilendiamina, no deben de presentar un color rosado que se torna a violeta, de lo contrario la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Pseudomonas***.

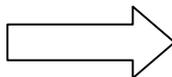
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 8 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

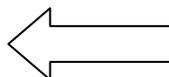
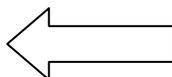


Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).

Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T° que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.



Incubar de 30-35 °C durante 24 h.



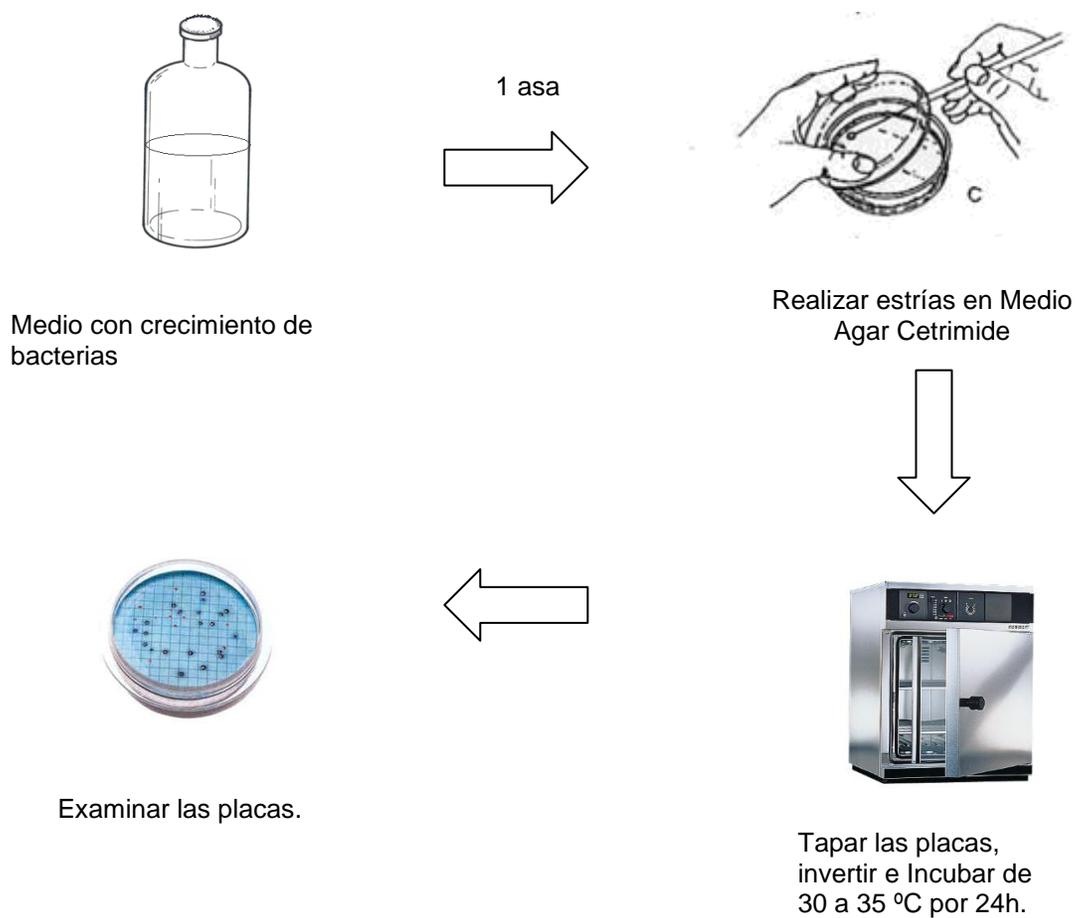
Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL de medio Líquido Digerido de Caseína y Soya.

Medir 10 mL de muestra

NOTA: Examinar el medio líquido de caseína y soya; y ver si hay crecimiento, si lo hay seguir el procedimiento.

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 9 de 12 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

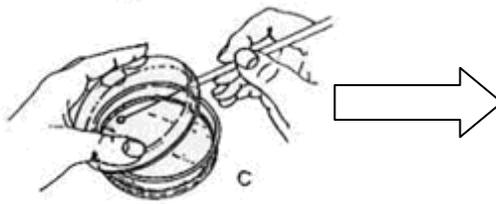
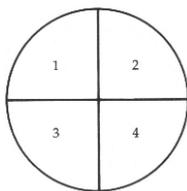


| | | |
|---|--|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 10 de 12 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

Prueba de Oxidasa y de Pigmentos (Para determinar la ausencia de

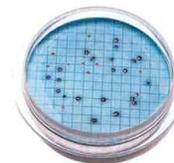
Pseudomonas aeruginosa)



Transferir de las colonias sospechosas del Medio Agar Cetrimide a la superficie de Medio Agar ***Pseudomonas*** para la detección de fluorescina y pirocianina contenidas en las placas de petri.

Tapar las placas, invertir e Incubar de $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por no menos de 3 días.

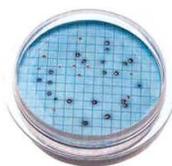
NOTA: Si se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir el medio de la placa en cuadrantes e inocular una colonia en cada uno de ellos.



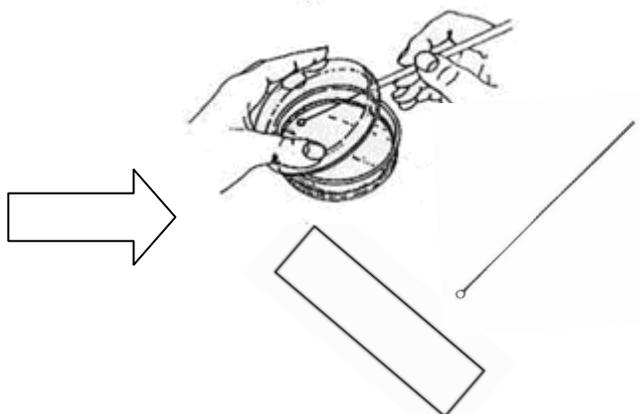
Examinar las placas bajo luz UV.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 11 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

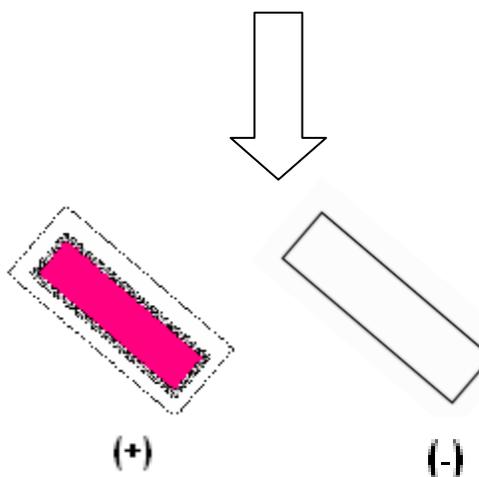
...continuación de Determinación de ***Pseudomonas aeruginosa***.



Crecimiento de ***Pseudomona aeruginosa***



Transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.



No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página : 12 de 12 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo y de Diagnóstico.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Fluorescencia en luz UV | Prueba de Oxidasa | Tinción Gram |
|---|---|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Medio Agar Ceftrimida | Generalmente verdoso | Verdoso | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de fluorescencia | Generalmente incoloro a amarillo | Amarillento | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar Pseudomonas para la detección de Píocianina | Generalmente verdoso | Azul | Positivo | Bacilos negativos |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 1 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Salmonella spp*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en cera, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

TSI: Medio Agar Triple Azúcar-Hierro

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FUNDADA EN 1969 UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 3 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Salmonella crece con facilidad en Agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología clínica se aísla con medios selectivos, Selenito, SS o Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprófita.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Balanza
- d) Asa de inoculación
- e) Incubadora
- f) Mortero y pistilo
- g) Cajas petri
- h) Erlenmeyer de 250 mL

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 4 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y reactivos

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Líquido de Selenito-Cistina
- c) Medio Líquido de Tetracionato
- d) Medio Agar Verde Brillante,
- e) Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- f) Medio Agar Sulfito de Bismuto

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y adicionar a 90 mL de Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 5) Examinar el medio para verificar el crecimiento,

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

6) Si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa).

PRUEBA PARA ***Salmonella spp.***

- 1) Pipetear porciones de 1 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24 h.
- 2) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías en los Medios Agar Selenito-Cistina y Tetrionato sobre la superficie de Medio Agar Verde Brillante, Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y del Medio Agar Sulfito de Bismuto contenido en placas petri.
- 3) Tapar, invertir las placas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- 4) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia del género ***Salmonella***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 5) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI), estriando primero la superficie inclinada y luego clavar bien el alambre por debajo de la superficie.
- 6) Incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h
- 7) Examinar. Ninguno de los tubos debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

IV. CALCULOS

No aplica

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Ninguno de los tubos con medio Agar triple azúcar-hierro debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 7 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

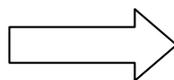
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 8 de 11 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de ***Salmonella***.

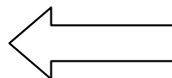
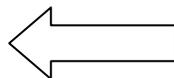


Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).

Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T° que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.



Incubar de 30-35 °C durante 24 h.



Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL de medio Líquido de Lactosa

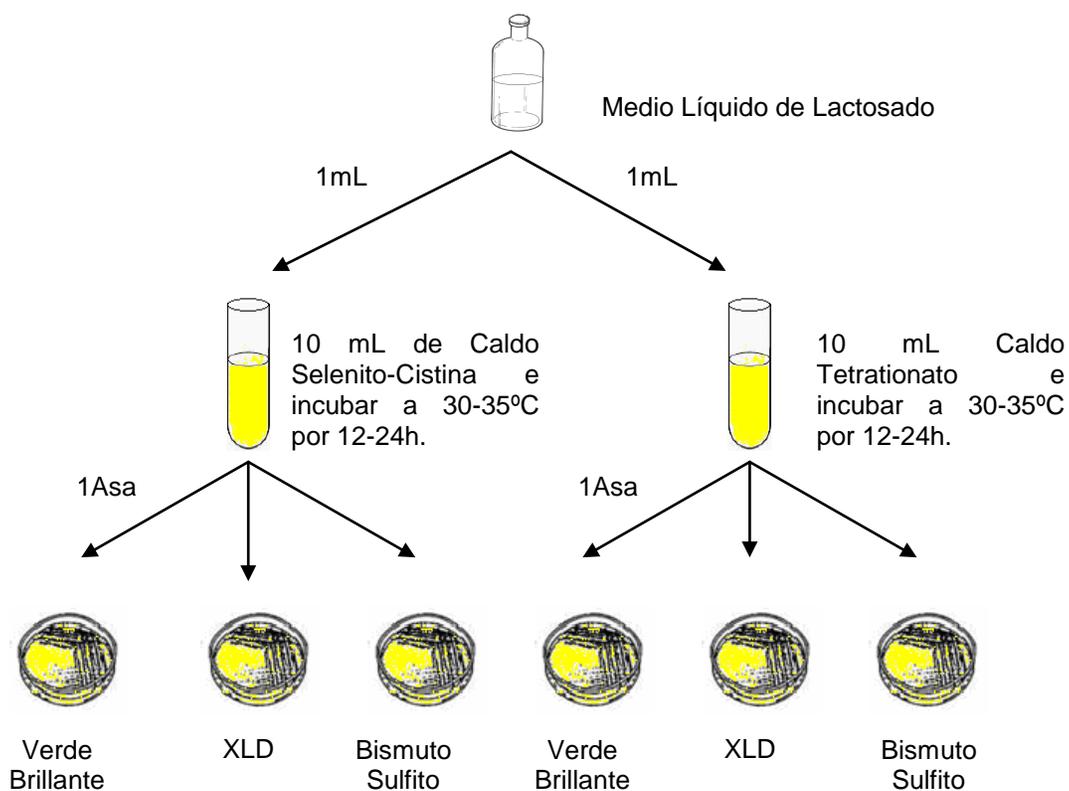


Medir 10 mL de muestra

NOTA: Examinar el medio y ver si hay crecimiento, si lo hay seguir el procedimiento.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 9 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de Prueba de Ausencia de ***Salmonella spp.***

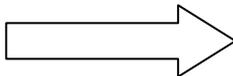
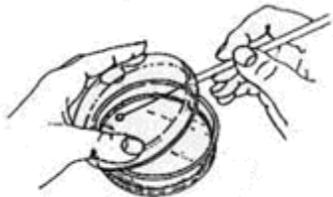


Tapar las placas, invertir e incubar a 30-35 °C por 24 h.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 10 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

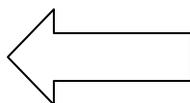
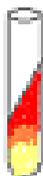
...continuación prueba Ausencia de ***Salmonella spp.***

Si se encuentran colonias sospechosas proceder con identificación adicional



Transferir colonias sospechosas individualmente con la ayuda de un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro.

Estriar la superficie inclinada y luego clavar el alambre bien por debajo de la superficie



Examinar el tubo

Incubar a 30-35 °C por 24 h.
Examinar el tubo

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas **de *Salmonella spp*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias |
|---------------------------------------|--|
| Medio Agar Verde Brillante | Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo). |
| Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato | De color rojo, con o sin centros negros |
| Medio Agar con Sulfito de Bismuto | De color negro o verde |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Escuela de Hospital por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en cera, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

EMB: Agar Levine Eosina Azul de Metileno

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Escuela de Medicina por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia de la Historia por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La prueba de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de medicamentos no estériles comprende la inoculación de la muestra en Medio Líquido de Lactosa, en la cual se comprueba el crecimiento de microorganismos coliformes Gram negativos; de ésta se toman pequeñas porciones con asa para inocular en Medio Agar McConkey y si presenta el crecimiento de colonias sospechosas,

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Escuela de Ingeniería por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

se realiza una prueba confirmativa de ***E. coli***, la cual consiste en resembrar las colonias sospechosas en Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Mortero y pistilo
- c) Balanza
- d) Asa de inoculación
- e) Incubadora
- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios de cultivo y reactivos

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Agar McConkey.
- c) Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno
- d) Polisorbato

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Escuela de Historia y Geografía</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y adicionar a 90 mL de Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 5) Examinar el medio para verificar el crecimiento, el cual no debe de presentar turbidez. Si presenta turbidez, continuar con la prueba.
- 6) Mezclar el medio agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)
- 7) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar McConkey.
- 8) Cubrir las placas , invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Escuela de Historia por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

9) Examinar las placas. Si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.

10) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a la superficie de Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno (EMB) colocado en cajas de petri.

NOTA: Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con colonia diferente.

11) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.

12) Examinar las placas y ninguna de las colonias debe exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada ni presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida, si lo presentan la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 7 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra cumpla con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, ninguna de las placas con Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno debe de exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada y ninguna debe presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida.

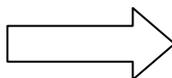
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 8 de 10 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de ***Escherichia coli***

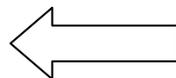


Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).

Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T^o que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.



Incubar de 30-35 °C durante 24 h.



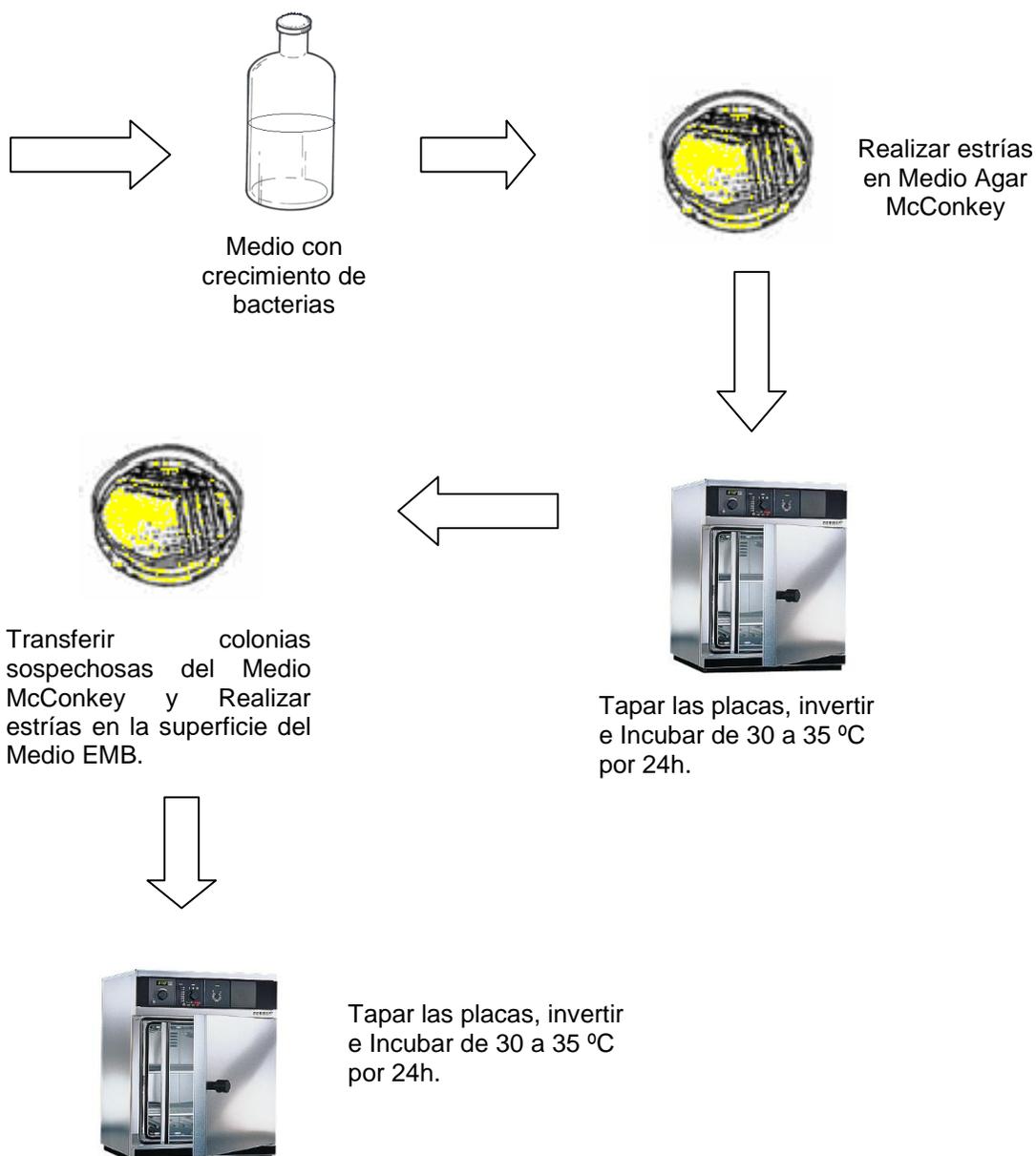
Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL de medio Líquido de Lactosa



Medir 10 mL de muestra

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de Prueba de Ausencia de ***Escherichia coli***



| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0004 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Escherichia coli</i> | Página : 10 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Escherichia coli*** en Medio Agar McConkey.

| Tinción Gram | Morfología Característica de las Colonias |
|-----------------------------------|--|
| Bacilos negativos (cocos-bacilos) | De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor |

| | | |
|--|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 1 de 9 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para Recuento Total combinado de Hongos y levaduras en productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o traslucidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Agente emulsionante: (emulsionante) Sustancia química que permite que la grasa se fraccione en pequeños glóbulos que quedan en suspensión en un medio acuoso.

Hongo: organismos protistas no fotosintéticos que se proliferan como una masa de filamentos ramificados entrelazados (hifas), que se conoce como micelio.

Moho: Hongos con formas miceliales (hifas).

Levadura: célula mitótica sencilla oval o redonda, que no forman micelio y forman yemas para reproducirse.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 2 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 3 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Los hongos son un grupo de diversos organismos unicelulares que se alimentan mediante la absorción directa de los nutrientes.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular.

Para el recuento se realizara el análisis por medio del método de placa vertida.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 4 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Sabouraud Dextrosa
- c) Medio Agar Papa Dextrosa

III. PROCEDIMIENTO

METODO EN PLACA

- 1) Preparar una suspensión agregando una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (uno de los polisorbatos).
- 2) Mezclar con un agitador mecánico.
- 3) Calentar a una temperatura de 45 °C si fuera necesario.
- 4) Medir 10 mL de la suspensión de la muestra y disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 5) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Papa Dextrosa o Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 5 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Cubrir las placas de petri.
- 7) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- 8) Invertir las placas de petri e incubar durante 5-7 días.
- 9) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 10) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL de muestra.
- 11) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g o por mL de muestra”.

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 6 de 9 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

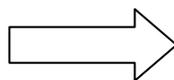
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 7 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO

Recuento Total de Hongos y Levaduras



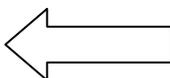
Preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril (Ej. un Polisorbato).



Mezclar en un mezclador mecánico y calentando a una T° que no exceda los 45 °C, si fuera necesario.

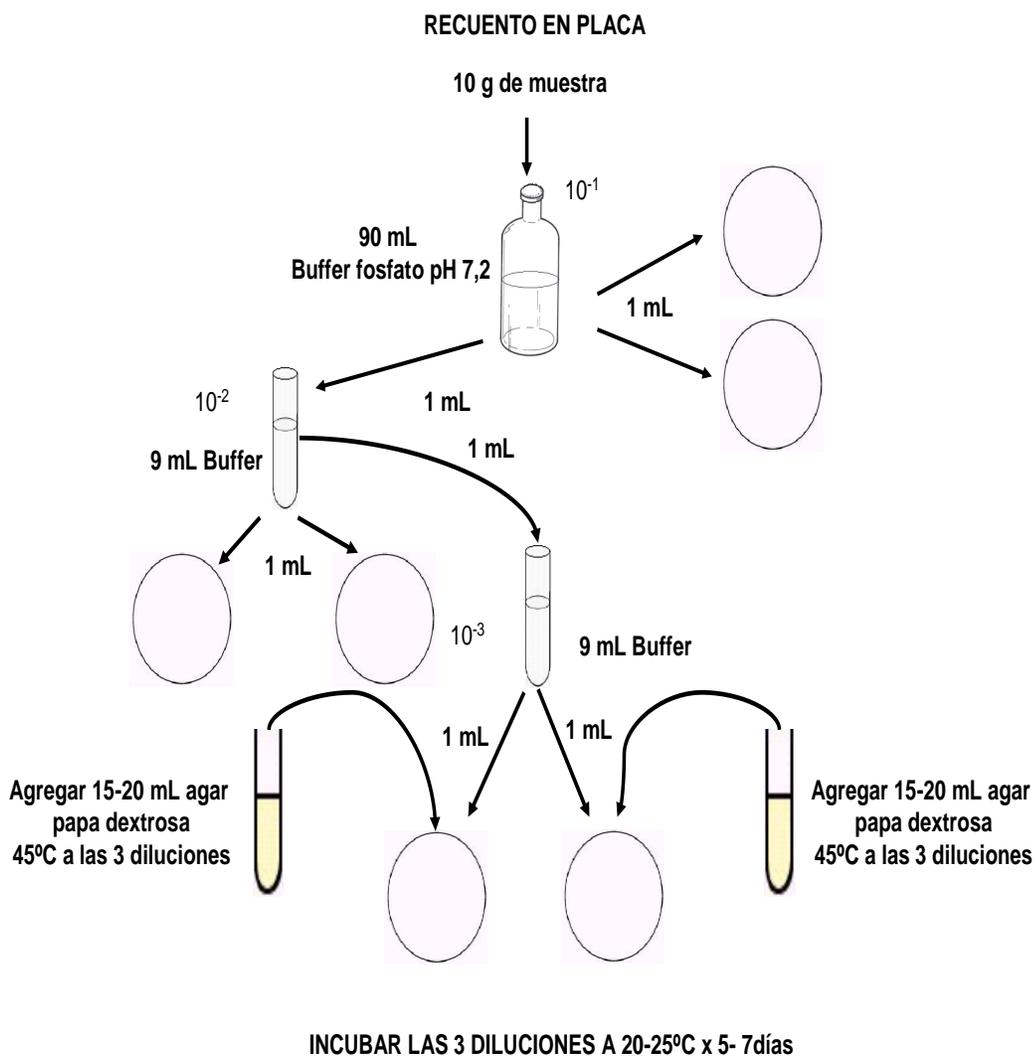


Agregar los 10 mL de muestra a 90 mL solución amortiguadora fosfato pH 7,2.



Medir 10 mL de muestra

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 8 de 9 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |



| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0004 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 9 de 9 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica.

**PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS
NO ESTÉRILES (MUESTRAS LÍQUIDAS EN FORMA
DE AEROSOL).**

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina aerosol a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C.

Microorganismos Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC): expresa el número de colonias originales a partir de una célula, pares, cadenas o agrupaciones de células.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El método utilizado para realizar el análisis de recuento total de bacterias aerobias mesófilas se llama placa vertida. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por la cual están incluidas en el término “Unidades Formadoras de Colonia (UFC)”.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri estéril
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias Québec
- h) Termómetro
- i) Frascos de dilución

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Digerido de Caseina y Soja

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.
- 4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido de Lactosa, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

- 5) Pesar asépticamente 10 g ò 10 mL de muestra en recipientes estériles y disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más si fuera necesario en diluciones decimales de 10^{-2} , y 10^{-3} , para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- 6) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>En busca de la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.

- 7) Cubrir las placas de petri.
- 8) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- 9) Invertir las placas de petri e incubar durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- 10) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 11) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.
- 12) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 7 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

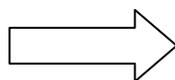
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

| | | |
|---|---|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 8 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

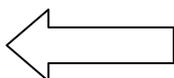
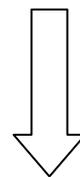
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Escherichia coli*



Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1 hora aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible

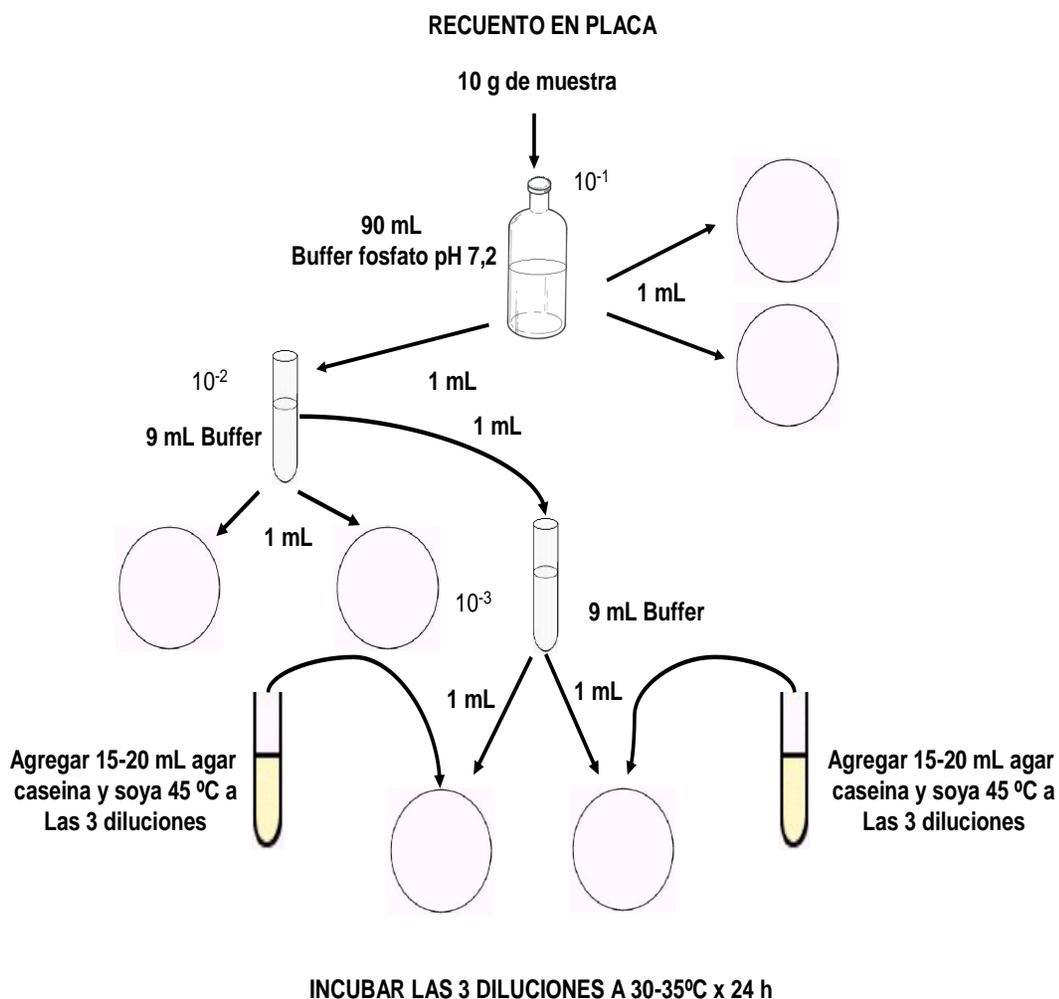


Agregar a 90 mL de Buffer fosfato pH 7,2.

Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de procedimiento de recuento de bacterias.



| | | |
|---|---|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTBP0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos Aerobios (Método en Placa) | Página: 10 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para recuento total de microorganismos aerobios en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en aerosol que no son lo suficientemente solubles o traslucidas.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina aerosol a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Bacteria: microorganismo unicelular que se presentan en diferentes formas incluyendo, barras y espirales, muchas de ellas poseen propiedades patógenas.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C.

Microorganismo Aerobios: organismos que necesitan del oxígeno biatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Número Más Probable (NMP): es el número que da un valor estimado de la densidad media de las bacterias.

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 3 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El recuento total de microorganismos aerobios por medio de la Técnica de los tubos múltiples consiste en la inoculación de diferentes volúmenes de muestra en una serie de tubos de ensayo que contienen caldo de cultivo nutritivo. Después de un período de incubación a una temperatura determinada se observa el crecimiento de los microorganismos por la turbidez del medio.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <small>1968</small> Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) 14 tubos de ensayo
- b) Pipeta de 1 mL estéril
- c) Pipeta de 10 mL estéril
- d) Balanza
- e) Incubadora

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseína y Soja

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido de Lactosa, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

5) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra en recipientes estériles y disolver o suspender en Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7,2, Medio líquido de Caseína y Soya, o Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de soya-Polisorbato 20 para obtener 100 mL.

6) En cada uno de 14 tubos de ensayo de tamaño similar, colocar 9 mL de Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya estéril.

7) Distribuir 12 tubos en cuatro grupos de 3 tubos cada uno.

8) Separar un grupo de 3 tubos para utilizarlos como control.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 9) Pipetear 1 mL de la solución o suspensión de la muestra y transferir a cada uno de los tres tubos de un grupo (“100”) y a un cuarto tubo A, y mezclar.
- 10) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir al tubo restante B, no incluido en un grupo y mezclar (estos tubos contienen 100mg ó 100µL y 10mg ó 10µL de la muestra respectivamente).
- 11) Pipetear 1 mL del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos del segundo grupo (“10”) y pipetear 1 mL del tubo B y transferir a cada uno de los tres tubos del tercer grupo (“1”).
- 12) Desechar el contenido no utilizado de los tubos A y B.
- 13) Cerrar bien e incubar todos los tubos a una temperatura de 30 a 35°C por 48-72 h.
- 14) Una vez transcurrido el tiempo de incubación examinar los tubos para verificar el crecimiento de los microorganismos; los tres tubos control se mantienen transparente y los resultados observados en los tubos que contienen la muestra, interpretarlos según la tabla (ver anexo)

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 7 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

indican el Numero Más Probable (NMP) de microorganismos por g ó por mL de muestra.

IV. CALCULOS

Los resultados observados en los tubos que contienen las muestras, interpretarlos según tabla (ver anexo).

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Los tubos que presentan turbidez se consideran como positivos y los que no presentan turbidez como negativos.

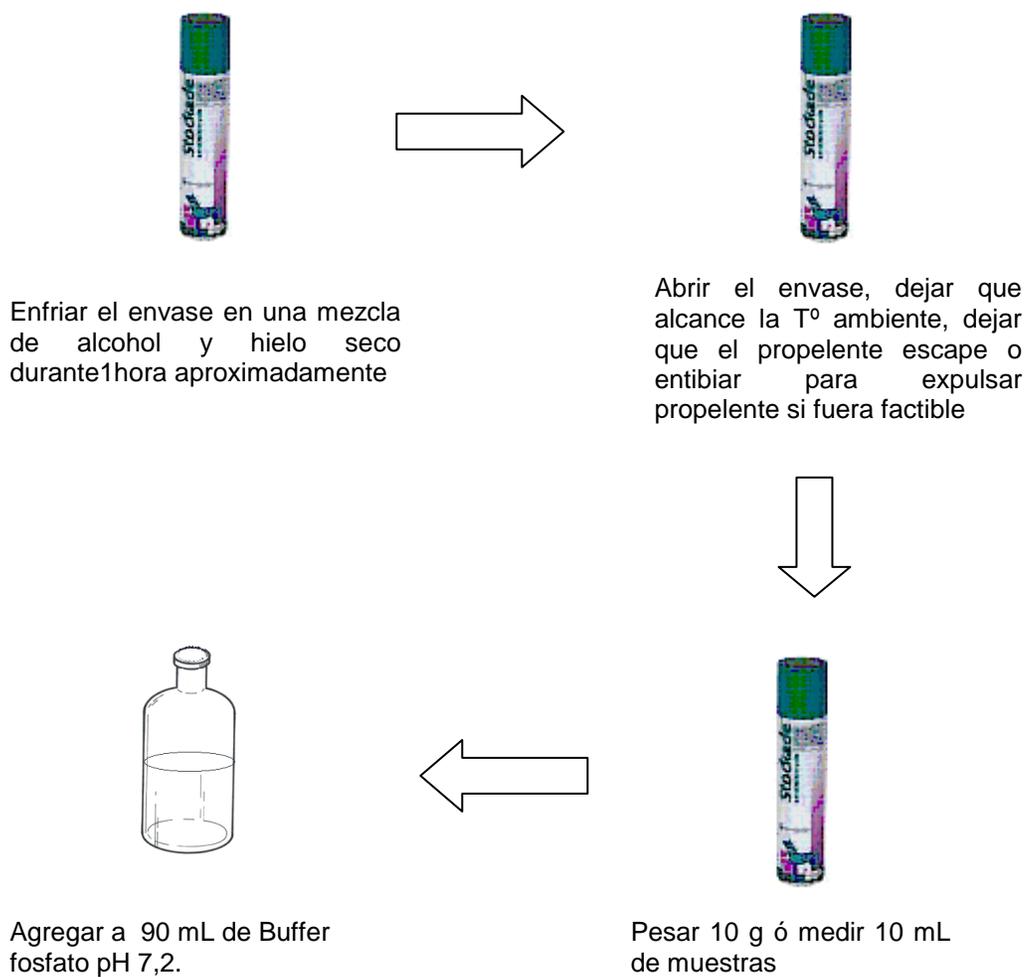
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.

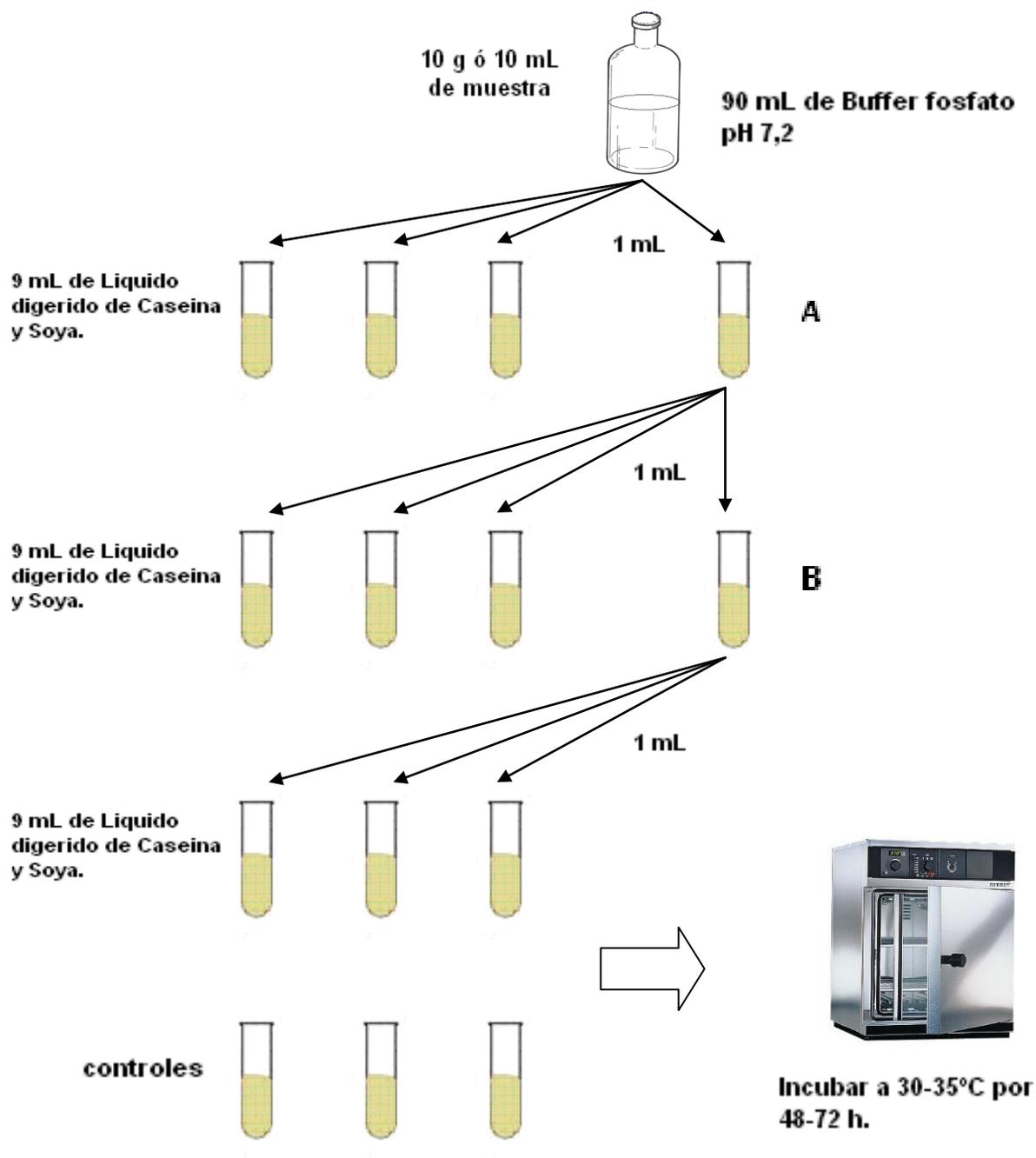
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 8 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i></p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |



| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MCTBT0005 |
| | Recuento Total de Microorganismos aerobios (Método Tubos Múltiples) | Página: 10 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Recuento Total Más Probable por el Método en Tubos Múltiples.

| Combinaciones Observadas de Números de Tubos que evidencian crecimiento en cada grupo | | | Número Más Probable de Microorganismos por g ó por mL. |
|---|--------------|------------|--|
| Nº de mg (o mL) de muestra por tubo | | | |
| 100 (100µL) | 10 (10µL) | 1 (1µL) | |
| 3 | 3 | 3 | <1100 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 3 | 3 | 1 | 500 |
| 3 | 3 | 0 | 200 |
| 3 | 2 | 3 | 290 |
| 3 | 2 | 2 | 210 |
| 3 | 2 | 1 | 150 |
| 3 | 2 | 0 | 90 |
| 3 | 1 | 3 | 160 |
| 3 | 1 | 2 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 70 |
| 3 | 1 | 0 | 40 |
| 3 | 0 | 3 | 95 |
| 3 | 0 | 2 | 60 |
| 3 | 0 | 1 | 40 |
| 3 | 0 | 0 | 23 |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 1 de 11 |
| Elaborado por: | Revisado por: | Vigente a partir de: |
| | | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Staphylococcus aureus*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en aerosol.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina aerosol a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Anaerobio facultativo: que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>España la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 3 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

El ***Staphylococcus aureus*** es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel y fosas nasales del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad. Por ser una bacteria de la flora normal de la piel esta constituye un riesgo de contaminación en la fabricación de los medicamentos.

S. aureus es coagulasa positivo, lo cual constituye su característica más distintiva.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Tubos de ensayo
- e) Balanza

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 4 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- f) Lámpara de luz UV
- g) Incubadora
- h) Baño de Maria
- i) Tiras o discos de papel filtro

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Vogel-Johson
- d) Medio Agar Baird-Parker
- e) Medio Agar Manitol Salado

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

5) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra en recipientes estériles y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.

6) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson o (Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado), cada uno de ellos colocado en placas petri.

| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 7) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.

Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo. (Ver anexo).

PRUEBA DE COAGULASA (para ***Staphylococcus aureus***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson(o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos individuales que contengan cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero preferiblemente de conejo o caballo, con o sin aditivos.
- 2) Incubar en un baño de agua a 37°C, examinando los tubos a las 3 h y sucesivamente a intervalos adecuados hasta las 24 h.
- 3) Realizar las pruebas de los controles negativos y positivos con las muestras desconocidas.
- 4) No debe de formar ningún grado de coagulación.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 7 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

Si los tubos con plasma no presentan ningún grado de coagulación la muestra cumple con requisitos para confirmar la ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

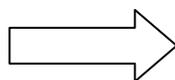
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 8 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

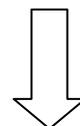
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de ***Staphylococcus aureus***.



Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1h aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible



Agregar Medio Líquido de Caseína y soya para obtener 100 mL.

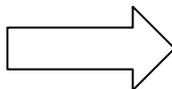
Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 9 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Staphylococcus aureus***.

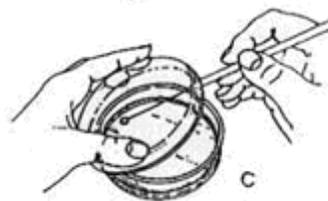
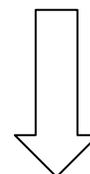


Incubar a 30-35 °C
durante 24 h.



Medio con crecimiento de
bacterias

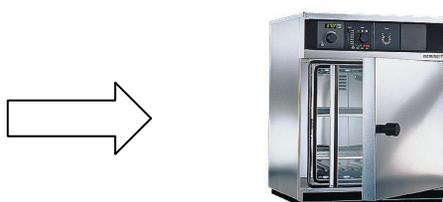
NOTA: Examinar el medio líquido de
caseína y soya, ver si hay crecimiento;
si lo hay seguir el procedimiento.



Sembrar en Medio Vogel-Johnson (o
Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar
Manitol Salado)

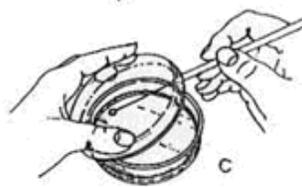
| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 10 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Staphylococcus aureus***

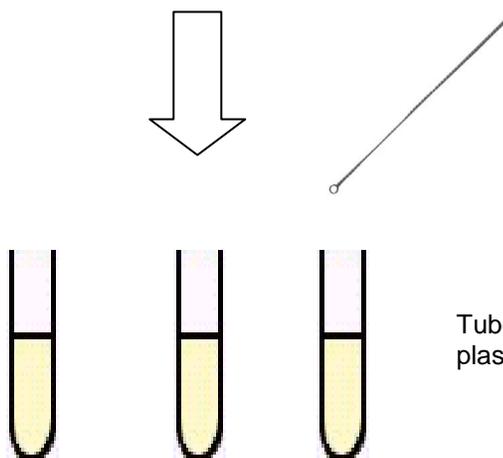


Tapar las placas, invertir e incubar a 30-35 °C durante 24h.

Prueba de Coagulasa (para ***Staphylococcus aureus***)



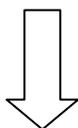
Transferir colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos con 0.5 mL de plasma.



Tubos inoculados en 0.5 mL de plasma de conejo o caballo

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MSA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> | Página: 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de ***Staphylococcus aureus***



Incubar en baño de María a 37 °C y examinar los tubos a las 3 h y subsecuentemente a intervalos adecuados hasta las 24 h.

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Staphylococcus aureus*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Tinción Gram |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Medio Agar Vogel-johnson | Negro, rodeado de una zona amarilla | Cocos positivos (en grupos) |
| Medio Manitol Agar Salado | Colonias amarillas con zonas amarillas | Cocos positivos (en grupos) |
| Medo Agar Baird-Parker | Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5mm. | Cocos positivos (en grupos) |

| | | |
|---|--|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 1 de 13 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en aerosol.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina aerosol a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

Luz UV: luz ultra violeta

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la Libertad por la Cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 2 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Esencia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 3 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos.

Como otras ***Pseudomonas***, ***P. aeruginosa*** secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso) y fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente). En medio Agar Pseudomona se evidencia claramente el desarrollo de estos pigmentos lo cual sirve de gran manera para su identificación.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Pipeta de 10 mL
- b) Cajas petri
- c) Asa de inoculación
- d) Tubos de ensayo
- e) Balanza
- f) Lámpara de luz UV
- g) Incubadora

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 4 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- h) Baño de Maria
- i) Tiras o discos de papel filtro

Medios y reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Líquido Digerido de Caseina y Soya
- c) Medio Agar Cetrimide
- d) Medio Agar Pseudomona

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.
- 4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Porque la libertad para la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 5 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

- 5) Pesar asépticamente 10 g ó 10 mL de muestra en recipientes estériles y suspenderlo en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 6) Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocado en placas petri.
- 7) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.
- 8) Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver anexo).

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 6 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

PRUEBA DE OXIDASA Y DE PIGMENTOS (para ***Pseudomonas aeruginosa***)

- 1) Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas representativas de la superficie del Medio Agar Cetrimide, sobre Agar *Pseudomonas* para las detecciones fluorescencia y del Medio *Pseudomonas* para la detección de piocianina contenidas en las cajas de petri.

NOTA: Debe de retransferirse un número grande de colonias sospechosas.

- 2) Dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.
- 3) Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante no menos de tres días.
- 4) Examinar la superpie estriada bajo luz UV, para determinar si hay colonias presentes con las características mencionadas en la tabla Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo (ver anexo).

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 7 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

PRUEBA DE OXIDASA

Confirmar si el crecimiento de uno o más medios corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* por medio de la prueba de oxidasa.

- 1) Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que tenga impregnado previamente con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.
- 2) No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

La presencia de ***P. aeruginosa*** se puede confirmar mediante otros medios adecuados y pruebas bioquímicas con la prueba si es necesario.

IV. CALCULOS

No aplica

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Hacia la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 8 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Las colonias transferidas a los discos o tiras de papel filtro previamente impregnadas con Diclorohidrato de N,N- Dimetil-p-Fenilendiamina, no deben de presentar un color rosado que se torna a violeta, de lo contrario la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Pseudomonas***.

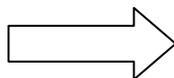
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 9 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

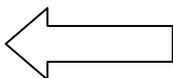
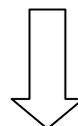
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.



Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1h aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible



Agregar Medio Líquido de Caseína y soya para obtener 100 mL.

Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

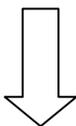
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 10 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

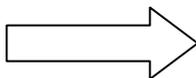


NOTA: Examinar el medio líquido de Caseína y soya; y ver si hay crecimiento, si lo hay seguir el procedimiento.

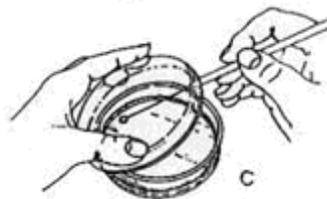
Mezclar e Incubar de 30 a 35 °C durante 24 h.



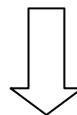
Medio con crecimiento de bacterias



1 asa



Realizar estrías en Medio Agar Cetrimide



Tapar las placas, invertir e Incubar de 30 a 35 °C por 24h.

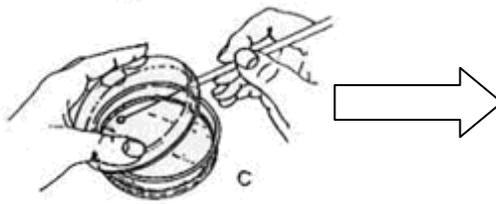
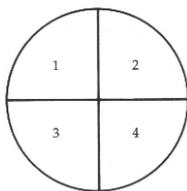


| | | |
|---|--|--|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 11 de 13 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia de ***Pseudomonas aeruginosa***.

Prueba de Oxidasa y de Pigmentos (Para determinar la ausencia de

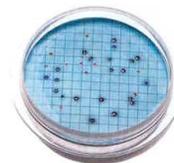
Pseudomonas aeruginosa)



Transferir de las colonias sospechosas del Medio Agar Cetrimide a la superficie de Medio Agar ***Pseudomonas*** para la detección de fluorescina y pirocianina contenidas en las placas de petri.

Tapar las placas, invertir e Incubar de $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por no menos de 3 días.

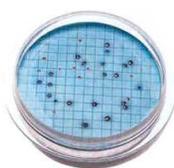
NOTA: Si se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir el medio de la placa en cuadrantes e inocular una colonia en cada uno de ellos.



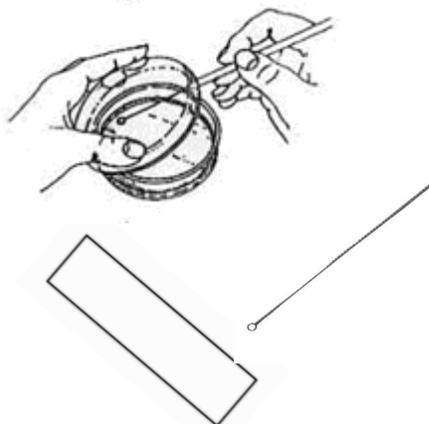
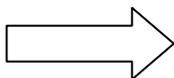
Examinar las placas bajo luz UV.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 12 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

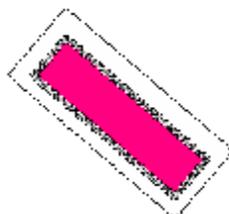
...continuación de Determinación de ***Pseudomonas aeruginosa***.



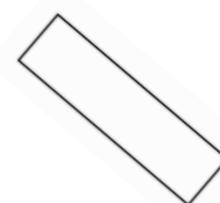
Crecimiento de ***Pseudomona aeruginosa***



Transferir las colonias a tiras o discos de papel filtro que se han impregnado con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.



(+)



(-)

No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MPA0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Página: 13 de 13 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Medio Agar Selectivo y de Diagnóstico.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias | Fluorescencia en luz UV | Prueba de Oxidasa | Tinción Gram |
|--|---|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Medio Agar Cetrimida | Generalmente verdoso | Verdoso | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar <i>Pseudomonas</i> para la detección de fluorescencia | Generalmente incoloro a amarillo | Amarillento | Positivo | Bacilos negativos |
| Medio Agar <i>Pseudomonas</i> para la detección de Piocianina | Generalmente verdoso | Azul | Positivo | Bacilos negativos |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <small>UNIVERSITY OF EL SALVADOR</small> Hacia la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 1 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de ausencia de ***Salmonella spp*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en aerosol.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

TSI: Medio Agar Triple Azúcar-Hierro

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  <p>Universidad de El Salvador España la libertad por la cultura</p> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 3 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Salmonella crece con facilidad en Agar sangre formando colonias de 2 a 3 milímetros. En laboratorios de microbiología clínica se aísla con medios selectivos, Selenito, SS o Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) para inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas y de la flora intestinal saprófita.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Balanza
- c) Asa de inoculación
- d) Incubadora
- e) Mortero y pistilo
- f) Cajas petri
- g) Erlenmeyer de 250 mL

Medios y reactivos

- a) Medio Líquido de Lactosa

| | | |
|--|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Por la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 4 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- b) Medio Líquido de Selenito-Cistina
- c) Medio Líquido de Tetrionato
- d) Medio Agar Verde Brillante,
- e) Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- f) Medio Agar Sulfito de Bismuto

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.
- 4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido de Lactosa, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 5) Pesar asépticamente 10 g ó 10 mL de muestra en recipientes estériles y suspenderlo en Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.
- 6) Examinar el medio para verificar el crecimiento,
- 7) Si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa).

PRUEBA PARA ***Salmonella spp.***

- 1) Pipetear porciones de 1 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24 h.
- 2) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios Agar Selenito-Cistina y Tetrionato sobre la superficie de Medio Agar Verde Brillante, Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y del Medio Agar Sulfito de Bismuto contenido en placas petri.
- 3) Tapar, invertir las placas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Enseña la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 4) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia del género ***Salmonella***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
- 5) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI), estriando primero la superficie inclinada y luego clavar bien el alambre por debajo de la superficie.
- 6) Incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.
- 7) Examinar. Ninguno de los tubos debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

IV. CALCULOS

No aplica

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 7 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

V. CRITERIO DE ACEPTACION

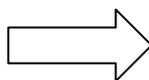
Ninguno de los tubos con medio Agar triple azúcar-hierro debe presentar superficies alcalinas (rojas) y fondos ácidos (amarillos), (con o sin ennegrecimiento concomitante de los fondos debido a la producción de sulfuro de Hidrógeno).

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la indumentaria adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

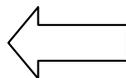
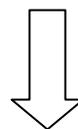
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 8 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1h aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible

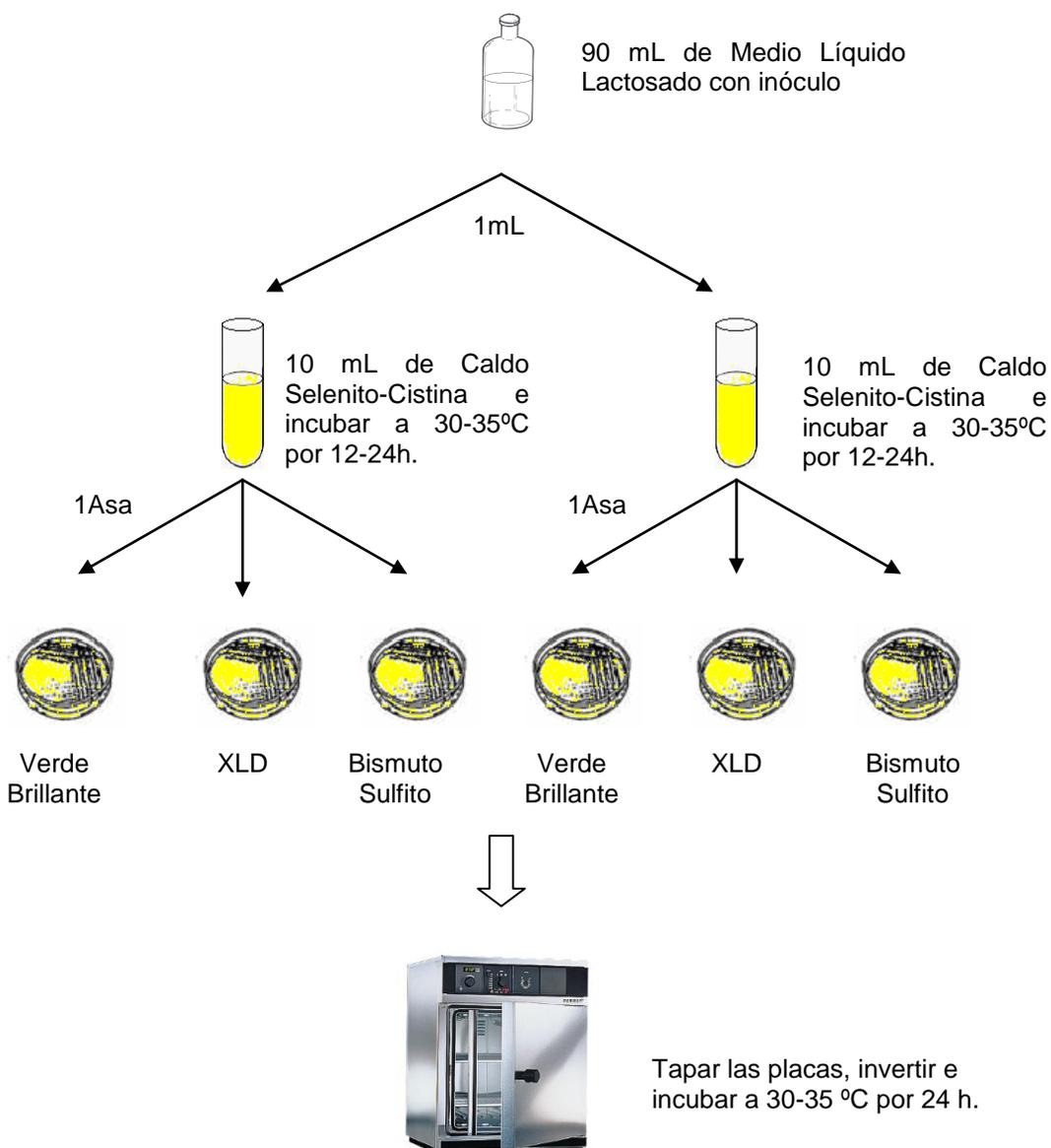


Agregar a 90mL Medio Líquido Lactosado e incubar a una T° de 30 a 35 °C por 24 h.

Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 9 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

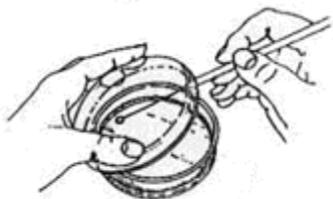
...continuación de determinación de ausencia de ***Salmonella spp.***



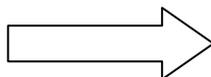
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 10 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de determinación de ausencia de ***Salmonella spp.***

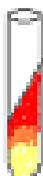
Si se encuentran colonias sospechosas proceder con identificación adicional



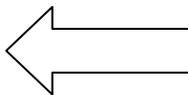
Transferir colonias sospechosas individualmente con la ayuda de un alambre de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro.



Estriar la superficie inclinada y luego clavar el alambre bien por debajo de la superficie



Examinar el tubo



Incubar a 30-35 °C por 24 h.
Examinar el tubo

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MS0005 |
| | Determinación de Ausencia de <i>Salmonella spp</i> | Página: 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Salmonella spp*** en Medio Agar Selectivo.

| Medio Selectivo | Morfología Característica de las Colonias |
|---------------------------------------|--|
| Medio Agar Verde Brillante | Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo). |
| Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato | De color rojo, con o sin centros negros |
| Medio Agar con Sulfito de Bismuto | De color negro o verde |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 1 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para la determinación de Ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras de productos farmacéuticos no estériles de presentación en aerosol.

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina aerosol a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Aséptico: Ausencia de microorganismos patógenos.

EMB: Agar Levine Eosina Azul de Metileno

Estéril: Exento de vida de cualquier clase.

TSI: Medio Agar Triple Azúcar-Hierro

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 2 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 3 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaría y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

La prueba de ausencia de ***Escherichia coli*** en muestras de medicamentos no estériles de presentación en aerosol comprende la inoculación de la muestra en Medio Líquido de Lactosa, en la cual se comprueba el crecimiento de microorganismos coliformes Gram negativos; de ésta se toman pequeñas porciones con asa para inocular en Medio Agar McConkey y si presenta el crecimiento de colonias sospechosas, se realiza una prueba confirmativa

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 4 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

de ***E. coli***, la cual consiste en resembrar las colonias sospechosas en Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno.

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Equipo

- a) Pipeta de 1 mL estéril
- b) Balanza
- c) Asa de inoculación
- d) Incubadora
- e) Cajas petri
- f) Erlenmeyer de 250 mL

Medios de cultivo

- a) Medio Líquido de Lactosa
- b) Medio Agar McConkey.
- c) Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno
- d) Alcohol
- e) Hielo seco

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 5 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.
- 3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.
- 4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda, de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido de Lactosa, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

- 5) Pesar asépticamente 10 g ó medir 10 mL de muestra en recipientes estériles y suspenderlo en Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 6 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- 6) Examinar el medio para verificar el crecimiento, el cual no debe de presentar turbidez. Si presenta turbidez, continuar con la prueba.
- 7) Mezclar el medio agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)
- 8) Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar McConkey.
- 9) Cubrir las placas , invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h
- 10) Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver anexo), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, de lo contrario proceder con una identificación adicional.
- 11) Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a la superficie de Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno (EMB) colocado en cajas de petri.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 7 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

NOTA: Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con colonia diferente.

12) Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.

13) Examinar las placas y ninguna de las colonias debe exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada ni presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida, si lo presentan la muestra no cumple con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***.

IV. CALCULOS

No aplica.

V. CRITERIOS DE ACEPTACION

Para que la muestra cumpla con la prueba de ausencia de ***Escherichia coli***, ninguna de las placas con Medio Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno debe de exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada y ninguna debe presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 8 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

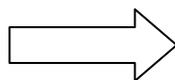
VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Utilizar la vestimenta adecuada para realiza el análisis (guantes, mascarilla, gorro y gabacha estéril).
- 2) El medio de cultivo a utilizar debe ser recientemente preparado y esterilizado.
- 3) Todo el material a utilizar debe de estar completamente estéril.
- 4) Las muestras a analizar deben de ser únicamente abiertas bajo cámara de flujo laminar.
- 5) Las temperaturas de incubación deben de ser controladas periódicamente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 9 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

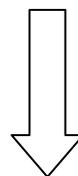
VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.

Determinación de Ausencia de *Escherichia coli*

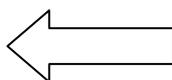


Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1 hora aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible



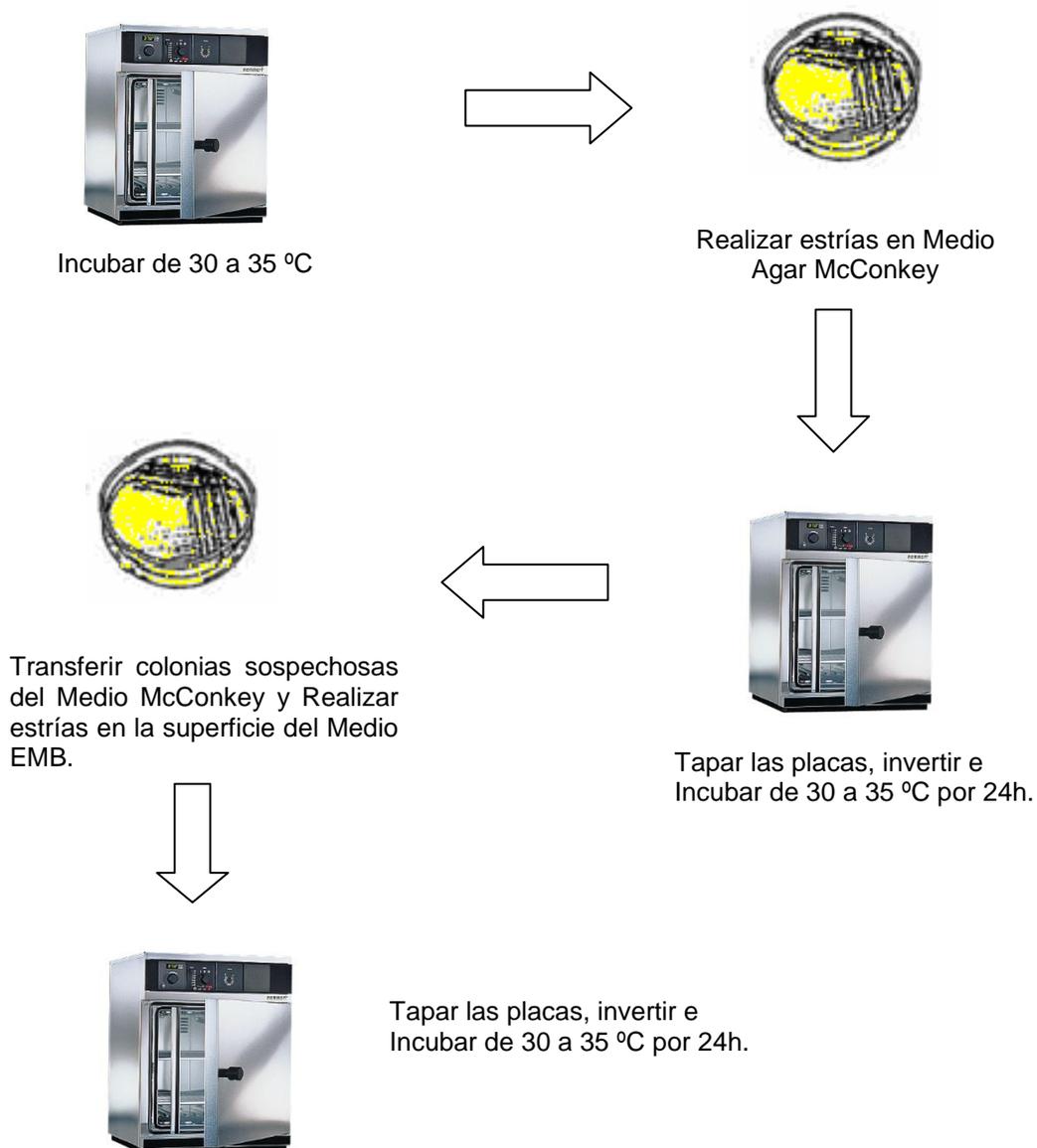
Agregar a 90 mL de Medio Líquido de Lactosa



Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 10 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de prueba de Ausencia ***Escherichia coli***



| | | |
|--|---|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>En busca de la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MEC0005 |
| | Determinación de Ausencia <i>Escherichia coli</i> | Página: 11 de 11 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

Tabla. Características Morfológicas de ***Escherichia coli*** en Medio Agar McConkey.

| | |
|-----------------------------------|--|
| Tinción Gram | Morfología Característica de las Colonias |
| Bacilos negativos (cocos-bacilos) | De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor |

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 1 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

A. OBJETIVO

Describir el procedimiento para el Recuento Total combinado de Hongos y Levaduras en muestras de productos farmacéuticos no estériles.

B. ALCANCE

El procedimiento es aplicable para muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas

C. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Aerosol: se denomina a una mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas suspendidas en un gas.

Hongo: organismos protistas no fotosintéticos que se proliferan como una masa de filamentos ramificados entrelazados (hifas), que se conoce como micelio.

Moho: Hongos con formas miceliales (hifas).

Levadura: célula mitótica sencilla oval o redonda, que no forman micelio y forman yemas para reproducirse.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 2 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

D. POLITICAS

- 1) Los resultados de los análisis son confidenciales y se entregarán únicamente a la persona o entidad que los solicitó.
- 2) Los métodos o procedimientos empleados para el análisis son de uso exclusivo del personal encargado de realizarlos, son además de carácter confidencial.
- 3) Los medios de cultivo empleados serán de calidad comprobada y de reciente preparación.

E. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad del analista, realizar los procedimientos de acuerdo a los métodos descritos para cada tipo de muestra, además deberá documentar los resultados.

| | | |
|---|--|---|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 3 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

F. REGISTRO DE CALIDAD

Cada muestra analizada debe ir acompañada por los siguientes documentos:

| DOCUMENTOS | RESPONSABLE |
|--|----------------------------------|
| Solicitud de análisis y entrega de muestra. | Secretaria y personal encargado. |
| Protocolo del analista. | Analista encargado. |
| Limpieza y sanitización del área de trabajo. | Auxiliar de laboratorio. |
| Monitoreo ambiental. | Analista encargado. |
| Fichas técnicas. | Auxiliar de laboratorio |
| Resultados de análisis. | Analista encargado. |

G. DESARROLLO

I. INTRODUCCION

Los hongos son un grupo de diversos organismos unicelulares que se alimentan mediante la absorción directa de los nutrientes.

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular.

Para el recuento se realizara el análisis por medio del método de placa vertida.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 4 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

II. EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVOS

Material y Equipo

- a) Balanza
- b) Pipeta de 10 mL estéril
- c) Pipetas de 1 mL estéril
- d) Cajas petri
- e) Baño de Maria
- f) Incubadora
- g) Cuenta colonias

Medios y Reactivos

- a) Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2
- b) Medio Agar Sabouraud Dextrosa
- c) Medio Agar Papa Dextrosa

III. PROCEDIMIENTO

- 1) Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora.
- 2) Abrir el envase y dejar que alcance la temperatura ambiente.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 5 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

3) Dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible.

4) Transferir la cantidad de material de prueba requerida para el procedimiento.

NOTA: Cuando no se puede obtener 10 g ó 10 mL de muestra, según corresponda de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio Líquido de Lactosa, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

5) Pesar asépticamente 10 g ó 10 mL de muestra en recipientes estériles y disolver en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.

6) Pipetear 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 6 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

Agar Papa Dextrosa o Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.

- 7) Cubrir las placas de petri
- 8) Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- 9) Invertir las placas de petri e incubar durante 5-7 días.
- 10) Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- 11) Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL de muestra.
- 12) En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra”.

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 7 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

IV. CALCULOS

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

V. CRITERIO DE ACEPTACION

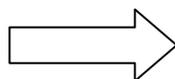
Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Québec.

VI. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- 1) Todos los utensilios y recipientes necesarios para pesar y preparar las muestras deben encontrarse completamente estériles para evitar contaminación.
- 2) La temperatura del Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, no debe ser mayor de 45° C al momento de verterlo.
- 3) Mezclar las placas varias veces con la técnica del ocho para asegurar la correcta y completa distribución de la muestra en el medio.
- 4) No deben de colocarse en columnas las cajas petri cuando se les esta vertiendo Agar y cuando se esta solidificando.

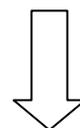
| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 8 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

VII. DIAGRAMA DE PROCEDIMIENTO.



Enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante 1h aproximadamente

Abrir el envase, dejar que alcance la T° ambiente, dejar que el propelente escape o entibiar para expulsar propelente si fuera factible

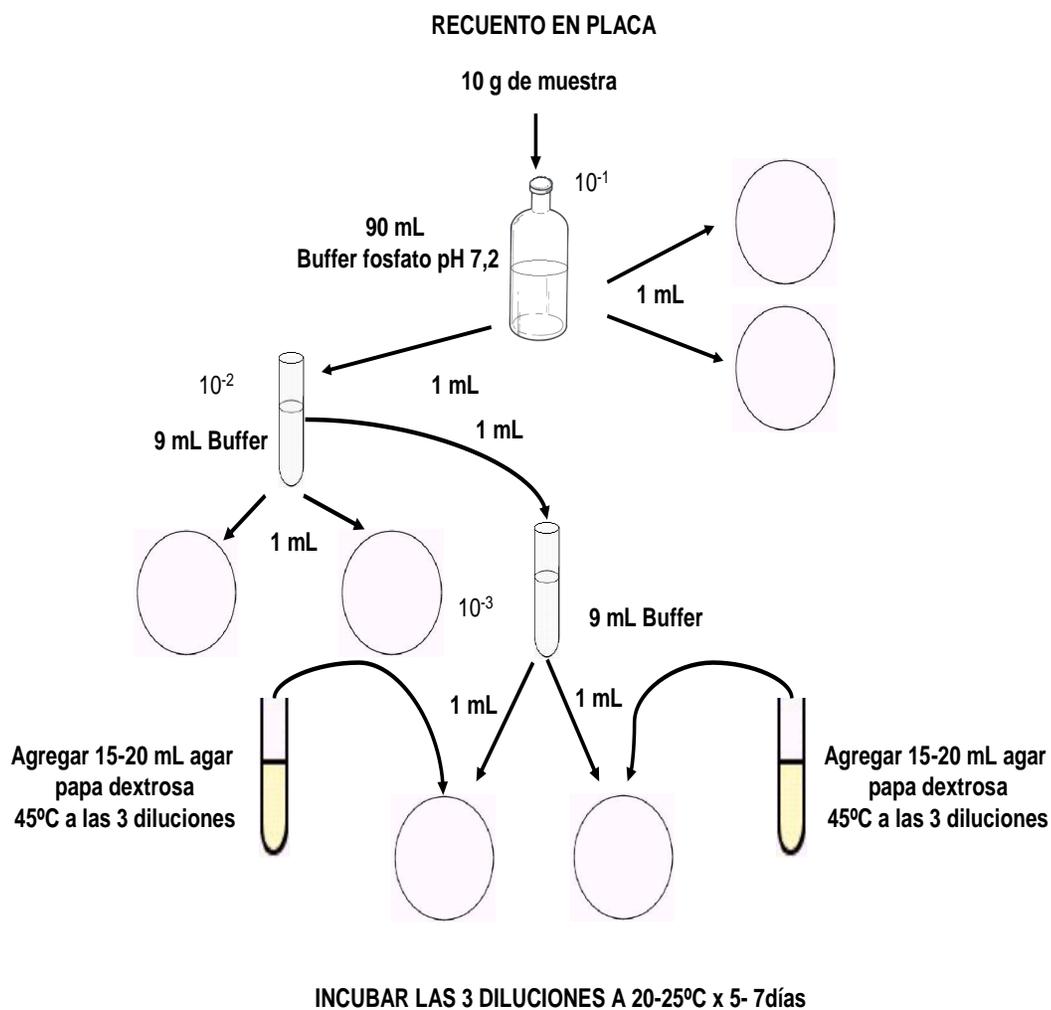


Agregar 90 mL de Buffer Fosfato pH 7,2 para obtener 100 mL.

Pesar 10 g ó medir 10 mL de muestras

| | | |
|---|--|----------------------|
|  | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 9 de 10 |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

...continuación de procedimiento de conteo de Hongos.



| | | |
|---|--|--|
|  Universidad de El Salvador <i>Apoyando la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: MRTH0005 |
| | Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa) | Página: 10 de 10 Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

H. BIBLIOGRAFIA

- The United States Pharmacopeia Convention, Farmacopea de los Estados Unidos USP 27, Apartado <61>, año 2004.

I. ANEXOS

No aplica.

5.3. REQUERIMIENTOS CON LOS QUE DEBE CONTAR UN LABORATORIO PARA OBTENER LA ACREDITACIÓN (NORMA ISO/IEC 17025:2005)₍₁₀₎.

5.3.1 REQUERIMIENTOS DE GESTION (ADMINISTRACION)

-ORGANIZACION

De acuerdo a lo establecido por la norma, éste debe de ser una entidad que pueda ser sujeta de responsabilidad legal; sus actividades de calibración y prueba deben ser llevadas a cabo de manera que cumpla con las cláusulas en ella descritas y satisfacer las necesidades del cliente, las regulaciones de las autoridades o de las organizaciones que proveen reconocimiento.

Si el laboratorio es parte de una organización que realiza actividades aparte de las pruebas y calibración, las responsabilidades del personal clave que está involucrado o influye en las actividades de calibración y prueba de laboratorio deben estar bien definidas para identificar potenciales conflictos de interés. Por otra parte hay una serie de requerimientos propios de la organización del laboratorio que se tienen que cumplir, los cuales son:

- Tener personal técnico y administrativo con la autoridad y recursos necesarios para llevar a cabo sus tareas e identificar la ocurrencia de desviaciones.
- Tener políticas y procedimientos para asegurar la protección de la información confidencial y derechos de propiedad de sus clientes, incluyendo

- procedimientos para proteger el almacenamiento y transmisión electrónica de resultados.
- Tener políticas y procedimientos para evitar participación en cualquier actividad que pudiera disminuir la confianza en su competencia, imparcialidad, juicio o integridad operacional.
 - Definir la estructura de la organización y dirección del laboratorio, del lugar en cualquier organización matriz y las relaciones entre el manejo de la calidad, operaciones técnicas y servicios de soporte.
 - Especificar la responsabilidad, autoridad e interrelaciones de todo el personal que maneja, desempeña o verifica el trabajo que afecta la calidad de las pruebas y/o calibraciones.
 - Proveer adecuada supervisión del personal de calibración y prueba, incluyendo entrenamiento por parte de personas familiarizadas con los métodos y procedimientos, propósitos de cada prueba o calibración con la interpretación de los resultados de las pruebas y calibraciones.
 - Tener dirección técnica que tenga responsabilidad total por las operaciones técnicas y la provisión de recursos necesarios para asegurar la calidad requerida en las operaciones del laboratorio.
 - Designar a un miembro del grupo de trabajo como director de calidad (o como sea que quiera llamarlo) que, a pesar de otras tareas y responsabilidades, tendrá responsabilidades definidas y la autoridad para asegurar que el sistema de calidad sea implementado y seguido todo el

- tiempo, el director de calidad tendrá acceso directo a los mas altos niveles de dirección en las que se toman las decisiones de políticas y recursos del laboratorio.
- Designar suplentes para el personal directivo clave (solo cuando sea necesario).

SISTEMA DE GESTIÓN

Es la estructura organizacional, procedimientos, procesos y recursos necesarios para implementar la calidad, es decir que es la forma como una organización va a realizar el trabajo en cumplimiento con la norma para asegurar la calidad en cada una de las operaciones.

Por tanto se debe de cumplir con lo siguiente:

- El laboratorio establecerá, implementará y mantendrá un sistema de calidad apropiado para el rango de sus actividades, igualmente documentada sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones en la extensión necesaria para asegurar la calidad de los resultados de prueba y calibración. La documentación del sistema será comunicada a, entendida por, disponible para, e implementada por el personal apropiado.
- Los objetivos y políticas del sistema de calidad del laboratorio serán definidos en un manual de calidad. Los objetivos generales, se documentarán en un instructivo de política de calidad. El instructivo de política de calidad debe ser emitido bajo la autoridad del jefe ejecutivo. Este

instructivo debe incluir lo que la norma 17025:05 específica en su numeral 4.2.2.

CONTROL DE DOCUMENTOS

Es necesario un sistema en el que se establezca y mantenga los procedimientos para controlar todos los documentos que forman parte de su sistema de calidad internamente generados o de fuentes externas, como regulaciones, normas, otros documentos normativos, métodos de prueba y calibración, etc.

El personal encargado de la documentación realizará la aprobación y emisión de documentos que estén de acuerdo con las actividades que se realizan y que estos estén vigentes y no obsoletos o inapropiados y se encuentren disponibles para consultarlos. Además los cambios que se realicen en los documentos serán revisados y apropiados por el mismo personal que revisó los originales a menos que se asigne a otro que tenga conocimientos de ellos.

REVISIÓN DE LAS SOLICITUDES, COTIZACIONES Y CONTRATOS

Es necesario la revisión de pedidos para satisfacer las necesidades o peticiones de sus clientes servirle de la mejor manera posible de la misma forma con las ofertas y contratos, que estos no interfieran con el cumplimiento de la norma de calidad, por lo que es necesario contar con procedimientos y políticas de revisión que aseguren la calidad de los resultados.

SUBCONTRATACION DE ENSAYOS Y/O CALIBRACIONES

Este es aplicable en el caso que el laboratorio requiera de dichos servicios; si este fuera el caso, el laboratorio antes de solicitar dicho servicio debe de estar seguro que este laboratorio cumpla con los requerimientos de la norma y además el cliente debe estar de acuerdo de dicha subcontratación.

COMPRA DE SERVICIOS Y SUMINISTROS

Para llevar a cabo dicho procedimiento el laboratorio debe contar con un método de evaluación de todos los suministros que pretenden ser emitidos al laboratorio, para determinar la calidad de los mismos y asegurar así, la calidad de los resultados de las pruebas que éste realiza, llevando un control de los proveedores que satisfacen sus expectativas y hacer mas fácil la elección de los productos a adquirir.

SERVICIO AL CLIENTE

El laboratorio debe de contar con políticas y procedimientos que den solución a todas las inquietudes que estos tengan respecto a las pruebas que solicitan, así como asegurarles una completa confidencialidad de los resultados de análisis que se les haya realizado.

QUEJAS

Además deben contar con políticas y procedimientos que se apliquen a las quejas recibidas por parte de los clientes, que aseguren soluciones y que mejoren los aspectos en los que haya discrepancia con los clientes.

CONTROL DE LAS NO CONFORMIDADES EN EL TRABAJO DE ENSAYO Y CALIBRACION

El laboratorio debe contar con políticas y procedimientos encaminados a aplicarse en el caso que se detecte una no conformidad en los resultados de los análisis, como por ejemplo el incumplimiento de alguno de los requerimientos con lo que se cuenta; dando paso al siguiente procedimiento.

MEJORAMIENTO

El laboratorio debe de mejorar continuamente la eficacia de su sistema de gestión mediante el uso de la política de la calidad, los objetivos de la calidad, los resultados de las auditorias, el análisis de los datos, las acciones correctivas y preventivas y la revisión por la dirección.

ACCIONES CORRECTIVAS

Antes de implementar la acción que nos encamine a corregir las no conformidades, se debe de hacer un estudio minucioso que nos ayude a determinar la causa de la no conformidad y así hacer más fácil la elección de la acción correctiva a implementar; igualmente se debe de monitorear las acciones correctivas, para estar seguro que fue la elección apropiada, que nos ayudo a solucionar el problema.

ACCIONES PREVENTIVAS

Luego de haberle dado solución a las no conformidades, es necesario implementar acciones que prevengan o eviten la ocurrencia de dicho problema.

CONTROL DE LOS REGISTROS

Se debe de llevar un registro de todos los procedimientos u operaciones que el laboratorio realice y que tenga que ver con el sistema de calidad, el cual debe ser confidencial y de exclusividad para el laboratorio, en el que tendrá acceso solo personal autorizado.

AUDITORIAS INTERNAS

Estas deben ser realizadas periódicamente por personal profesional calificado, para auditar dichas áreas asignadas que ayude a mantener el sistema de calidad adecuado.

REVISIONES POR LA DIRECCION

Se refiere a que la administración ejecutiva del laboratorio deberá conducir periódicamente una revisión del sistema de calidad del laboratorio y de las actividades de prueba y calibración, para asegurar la continuidad de su efectividad y ajuste.

La parte fundamental de los requerimientos de gestión se presenta a continuación:

5.3.2 REQUERIMIENTOS TÉCNICOS

Para toda organización que se encarga de llevar a cabo pruebas y calibraciones, este es un punto a tener muy en cuenta debido a que de estos depende en gran parte la fidelidad y confiabilidad de los resultados de los análisis que se realicen, por ello se tratara de explicar brevemente cada uno de estos requerimientos.

PERSONAL

Debe de ser personal capacitado y certificado para cada una de las actividades o labores que estén bajo responsabilidad, de tal forma que no sea él una causa de error directa de los resultados obtenidos en las pruebas, asegurando que este trabajo acorde con el sistema de calidad del laboratorio, aplicando las buenas prácticas de Laboratorio.

INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES

El laboratorio debe de contar con instalaciones que faciliten la correcta ejecución de las pruebas y calibraciones, es decir que deben cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura, de cómo deben de estar distribuidas cada una de las áreas con las que este cuenta evitando así, contaminaciones cruzadas u otro inconveniente que pueda afectar la calidad de los resultados. De igual forma se realiza un monitoreo y control para determinar que las condiciones ambientales sean las requeridas y no poner en riesgo los resultados de las pruebas y calibraciones.

ENSAYO Y METODOS DE CALIBRACION Y VALIDACION DE METODOS (ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE)

El laboratorio usará métodos y procedimientos apropiados para todas las pruebas y/o calibraciones dentro de su alcance. Estos incluyen el muestreo, manejo, transporte, almacenamiento, preparaciones de muestras o artículos a ser sometidos a ensayo y/o calibraciones.

El laboratorio tendrá instrucciones para el uso y operación del equipo relevante, el manejo y preparación de artículos que serán probados y/o calibrados donde la ausencia de algunas instrucciones pueden poner en peligro los resultados de los ensayos y/o calibraciones.

En esta parte es muy importante la elección del método a utilizar ya que este debe de ser el que cumpla con las necesidades del cliente, y al mismo tiempo con los requerimientos de normas nacionales, regionales, internacionales en caso que sean métodos no estandarizados, estos deben de contar con su respectiva validación antes de ser utilizados.

Esta validación no es más que la confirmación por verificación y la provisión de la evidencia objetiva de que los requerimientos particulares para uso específico planeado son cumplidos. El resultado de los análisis debe de ser el mismo las veces que se realice y con cualquier laboratorio que se ponga en práctica. Sin embargo, es de esperar que en algunos casos el resultado tenga cierto grado de variabilidad, pero este debe de estar dentro de un rango establecido, por lo que es necesario considerar ciertos aspectos que se mencionan en la norma 17025:05 como lo es la estimación de la incertidumbre de la medición llevando siempre un control de los datos obtenidos en dicho proceso de validación utilizando el equipo y procedimientos o programas adecuados para cada uno de los cálculos que se requieren para la validación.

EQUIPOS

Todo laboratorio debe de estar equipado adecuadamente con el rango de sus actividades, para facilitar la realización de los análisis. Este equipo debe de ser capaz de alcanzar la precisión requerida para la correcta ejecución de las pruebas y calibraciones; y además se debe de contar con personal capacitado para la operación de estos equipos. De igual forma todas las instrucciones actualizadas en su uso, mantenimiento, operación y una serie de requerimientos que se especifican en la norma 17025:05, así también se tendrá un programa establecido y procedimientos para la calibración del equipo, procedimientos para el manejo seguro, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento planificado del equipo de medición para asegurar apropiado funcionamiento.

TRAZABILIDAD DE LAS MEDICIONES

Todos los equipos utilizados para los ensayos o las calibraciones, incluidos los equipos para la mediciones auxiliares (por ejemplo, de las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o validez del resultado del ensayo, la calibración o el muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe de establecer un programa y un procedimiento para la calibración de los equipos.

MUESTREO

En el caso que los laboratorios cuenten con un plan de muestreo y este debe de estar basado en métodos estadísticos apropiados y tendrá procedimientos para registro de datos relevantes y operaciones relativas al muestreo. Estos registros incluirán el procedimiento de muestreo utilizado, la identificación de la persona que toma la muestra, etc.

MANIPULACIÓN DE LOS ÍTEMES DE ENSAYO Y CALIBRACION

El laboratorio debe de tener procedimientos para el manejo, transporte, recepción, protección, almacenamiento y retención de los objetos de prueba y calibración, incluyendo todas las provisiones necesarias para proteger la integridad de la prueba o calibración; evitando confusiones de las muestras y para proteger los intereses del laboratorio y el cliente.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE ENSAYO Y CALIBRACION.

El laboratorio tendrá procedimientos de control de calidad para monitorear la validez de las pruebas y calibraciones tomadas.

INFORME DE RESULTADOS

Los resultados de cada prueba o calibración realizadas por el laboratorio, serán reportadas de forma exacta, clara y objetiva, deberán de incluir toda la información requerida por el cliente y necesaria para la interpretación de los resultados, de igual forma se debe contar con reportes de prueba y certificados

de calibración el cual debe contener lo especificado en la norma y unas propias de el laboratorio que siempre debe de estar regido por la norma 17025:05.

5.4 LINEAMIENTOS PARA LA ACREDITACIÓN ⁽⁶⁾

El consejo Nacional de Ciencias y Tecnologías CONACYT, establece las actividades que deben seguirse para la prestación del servicio de Acreditación a cualquier Laboratorio oficial o privado, que se dedique a la realización de pruebas, análisis y mediciones científicas, médicas, investigativas, industriales e ingenieriles o de cualquier otra índole que lo solicite.

Los lineamientos establecidos son los que se presentan a continuación:

1. Presentar la solicitud de Acreditación al Director ejecutivo de CONACYT.
2. El Director ejecutivo refiere la solicitud al jefe del departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad (NMCC), a más tardar dos días hábiles después de recibida, este a su vez al Coordinador de Acreditación tres días después de haberla recibido.
3. Elaboración de cotización por parte de Coordinación de Acreditación y entrega de ésta al jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la calidad para su firma, así como una copia al jefe financiero y al director ejecutivo, así mismo el Coordinador de Acreditación entrega formatos de solicitud y cuestionario de información.

4. El solicitante llena el formato de la solicitud de Acreditación y el cuestionario de información, y los entrega junto con los manuales de calidad, los métodos a acreditar y al mismo tiempo paga la tarifa del servicio.
5. Contratación de auditores por parte del coordinador de Acreditación.
6. Presentación de nombres de auditores al Laboratorio solicitante y fecha propuesta para la realización de la auditoria.
7. Aceptación de los auditores y de la fecha propuesta, en forma escrita por parte del solicitante.
8. El Coordinador de acreditación le informa a los auditores seleccionados que han sido contratados para efectuar la auditoria y confirmar al laboratorio la fecha de la misma.
9. Reunión de los auditores para firmar el contrato y conocer la información proporcionada por el laboratorio solicitante.
10. Realización de la auditoria en el Laboratorio solicitante haciendo uso de la lista de verificación y el formato para no conformidades; al mismo tiempo CONACYT evalúa el desempeño de los auditores.
11. Presentación del informe de la auditoria junto a la lista de verificación y formato para no conformidades a la jefatura del departamento.
12. Posteriormente el jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad y el Coordinador de la unidad de acreditación revisan el informe proporcionado por los auditores y envían una copia al Laboratorio solicitante.

13. Si al revisar el informe, se demuestra que el Sistema de Calidad del Laboratorio no tiene NO CONFORMIDADES con relación a la norma con la que se esta acreditando, entonces el jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad solicita por escrito a la Dirección Ejecutiva la Acreditación del Laboratorio.
14. Si por el contrario, el informe indica la presencia de no conformidades, se le informa al Laboratorio solicitante que dispone de tres meses para corregir las no conformidades, para si obtener la acreditación.
15. Una vez corregidas las no conformidades, el solicitante informa por escrito a la jefatura del Departamento de Acreditación, para programar una nueva visita y verificar la corrección de las no conformidades, luego de verificadas los auditores presentan el informe respectivo a la jefatura del Departamento.
16. El jefe del Departamento de Normalización, Metrología y Certificación de la Calidad solicita por escrito a la dirección ejecutiva la Acreditación del Laboratorio.
17. La solicitud de acreditación se discute en la reunión más próxima de la Junta directiva.
18. Finalmente la Dirección Ejecutiva del CONACYT informa por escrito al Laboratorio solicitante el acuerdo tomado por la Junta Directiva sobre la Aprobación o no de la Acreditación.

CAPÍTULO VI
DISCUSION DE RESULTADOS

VI. DISCUSION DE RESULTADOS

En la entrevista realizada a los laboratorios acreditados que realizan análisis microbiológicos en medicamentos, se pudo verificar la forma en que estos realizan su trabajo y el esfuerzo aplicado para poder obtener y mantener su reconocimiento de acreditación, brindando así, resultados de mayor confianza.

Para obtener tal reconocimiento los laboratorios han tenido que cumplir con la Norma ISO/IEC 17025:05; lo cual implica la inversión de tiempo y recursos; tanto humanos como económicos, siendo lo económico una de las barreras mas difíciles de sobrepasar. También se han enfrentado a situaciones poco favorables, ya que no hay una entidad que exija que los análisis en medicamentos deban realizarse bajo procedimientos acreditados. Pero a pesar de las adversidades los laboratorios han superado las barreras y han conseguido un sistema de calidad confiable, lo que les permite demostrar que poseen óptimas condiciones de trabajo y un mejor desempeño en la búsqueda de la calidad de los resultados.

Con respecto a los procedimientos normalizados de análisis, se puede observar que el hecho de elaborarlos según lo establecido por la norma ISO/IEC 17025:05, los transforma en manuales más completos que garantizan la obtención de resultados de calidad, por lo tanto, el contar con procedimientos

normalizados que estén validados que cumplan con la norma ISO/IEC 17025:05 generan un paso indispensable para optar a la acreditación.

Los requerimientos establecidos por la Norma ISO/IEC 17025:05, se encuentran en este trabajo detallados de una forma sencilla para poder ser interpretados y aplicados a un laboratorio de análisis microbiológico.

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Todo laboratorio que realiza análisis microbiológicos en medicamentos no estériles deben contar con un manual de procedimientos que contengan todas las técnicas específicas para evaluar los diferentes tipos de muestras.
2. Los procedimientos contenidos en el manual deben ser procedimientos normalizados y validados, vigentes y adecuados a los medios con los que cuenta el laboratorio.
3. El manual de procedimientos debe facilitar y agilizar la ejecución de los análisis microbiológicos en medicamentos y disminuir los errores.
4. La acreditación de los procedimientos garantiza el cumplimiento del buen desarrollo de los análisis y la obtención de resultados confiables, ya que se trabaja bajo un sistema de calidad.
5. El sistema de calidad de un laboratorio debe de cumplir con los requerimientos exigidos en la norma ISO/IEC 17025:05 de acreditación de laboratorios de ensayo y/o calibración para recibir el reconocimiento de acreditación.

6. Los altos costos que conlleva el proceso de acreditación de los procedimientos, es una de las barreras más grandes a las que se han enfrentado los laboratorios para obtener y mantener la acreditación.

7. El reconocimiento de acreditación de un laboratorio aumenta el número de clientes y son tomados en cuenta por muchas instituciones para la realización de sus análisis.

8. La elaboración de manuales es indispensable para el buen funcionamiento del laboratorio constituyendo una herramienta útil en sus funciones; además se cumple con los requerimientos de la Norma ISO/IEC17025:05 para la acreditación.

CAPITULO VIII
RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES

1. Que los laboratorios que realizan análisis microbiológicos a los medicamentos no estériles cuenten con manuales de procedimientos normalizados y validados, basados en libros oficiales vigentes.
2. Que los procedimientos normalizados de análisis microbiológicos sean elaborados por personas profesionales, capacitadas; siguiendo el protocolo establecido para garantizar buenos resultados.
3. Que los procedimientos de los análisis microbiológicos sean respetados y llevados a cabo de la mejor manera, de una forma responsable y profesional por parte de las personas encargadas de realizar los análisis.
4. Que los analistas responsables de realizar los procedimientos cumplan las Buenas Prácticas de Laboratorio que están plasmados en ellos.
5. Que las áreas en las que se realizan los análisis microbiológicos cumplan con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

6. A los laboratorios que realizan análisis microbiológicos a medicamentos no estériles, que acrediten sus procedimientos y a los laboratorios acreditados que traten de obtener la acreditación de todos sus procedimientos de análisis y que los actualicen periódicamente para mantener la acreditación.

7. A los Organismos reguladores en El Salvador, para que se efectuó un control de calidad más estricto a los medicamentos no estériles que se elaboran en el país.

8. Que este manual sea utilizado como referencia por docentes, estudiantes y laboratorios de análisis microbiológicos como una guía para el desarrollo de procedimientos y de elaboración de manuales más específicos con procedimientos vigentes, de acuerdo a sus requerimientos.

BIBLIOGRAFIA

1. Aibot y otros. (En línea). Consultado 7/Mayo/2007. Disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa
2. Alexquendi y otros. (En línea). Consultado 7/Mayo/2007. Disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
3. Arévalo, A. y otros; 1993. Importancia de la evaluación microbiológica a cremas y lociones medicadas.
4. Arias, T. D. y otros; Glosario de medicamentos: Desarrollo, evaluación y uso (En línea). Publicado por Pan American Health Org, 1999, pág. 138.
5. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S.), en línea. El Salvador. Disponible en: www.conacyt.gob.sv. Lineamientos para la Acreditación.
6. CONACYT. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología E.S.), 1995, Reglamento de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Análisis. San Salvador, El Salvador, Pág. 3-10.

7. Flores, A. y otros; Manual de Procedimientos Normalizados de Análisis Microbiológico de Alimentos para un Laboratorio de Microbiología. 2005; Pág. 75-86.

8. Fincowsky F.; Manuales administrativos: Guías para su elaboración, (En línea). México, UNAM. Consultado 7/Mayo/2007. Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos13/mapro/mapro.shtml>

9. Frazier W.C. y otros. 1993. Microbiología de los alimentos, 4^o Edición, España; Zaragoza; Editorial Acribia. Pág. 3, 4, 24, 28,30.

10. ISO (Organización Internacional de Normalización), IEC (Comisión Electrotécnica internacional). 2005. NORMA INTERNACIONAL 17025, “Requerimientos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, 2^a Edición, Suiza.

11. Jawetz E, y otros. 1992. Microbiología Médica. 14^a Ed. Mexico. Manual moderno, pág. 231

12. Lazo, M. I. y otros; 1987, Aplicación de la pruebas de Limites Microbianos en Suspensiones de hidróxido de aluminio y magnesio y de Caolín-pectina.

13. Morza y otros. (En línea) documento disponible a través de los servicios de Internet en: <http://es.wikipedia.org/wiki/IMVIC>

14. Pelczal M. y otros. 1989. Microbiología. 4ª ed. Mexico. McGraw-Hill.
Pág. 58-60

15. The United States convention, inc. 2004; The United States Pharmacopeia USP 27, The National Formular NF 22. Washington D.C. 2004, Apartado <61>.

16. En línea documento disponible a través de los servicios de Internet en:
<http://www.lecc.com>

17. Morza y otros. (En línea) documento disponible a través de los servicios de Internet en: <http://es.wikipedia.org/wiki/IMVIC>"

18. Pablos y otros. (En línea) documento disponible a través de los servicios de Internet <http://es.wikipedia.org/wiki/Flagelo>

GLOSARIO

Contaminación: presencia de cualquier material extraño que hace impura a una sustancia o preparación ⁽¹¹⁾.

Hifas: son los filamentos que, reunidos, forman el micelio de la mayoría de los hongos (en sentido amplio) ⁽¹¹⁾.

IMVIC: Test utilizado en microbiología para reconocer bacterias. Se compone de cuatro pruebas: Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato; que corresponden a sus siglas. El resultado de este test se expresa mediante cuatro símbolos de suma o resta (+ o -) según el resultado de cada prueba, siguiendo siempre el orden establecido por las iniciales del método ⁽¹⁷⁾.

Mesófilo: cuando tiene una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20°C y 45°C. La temperatura mínima se encuentra en el rango de 15°C a 20°C y la temperatura máxima en torno a 45°C. La gran mayoría de los microorganismos son mesófilos, incluidos los patógenos ⁽¹¹⁾.

Micelio: está constituido por una masa de hifas y que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo ⁽¹¹⁾.

Microorganismo Aerobio: a los organismos que necesitan del oxígeno diatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse⁽¹¹⁾.

Microorganismos anaerobios: a los organismos que no necesitan oxígeno (O₂) para desarrollarse, a diferencia de los organismos aerobios ⁽¹¹⁾

Microorganismo patógeno: es cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa. Incluye a los virus, bacterias, hongos y protozoos⁽¹¹⁾.

Morfología: es la disciplina encargada del estudio de la forma y estructura de un organismo o sistema ⁽¹⁸⁾.

Motilidad: es un término de la biología para expresar la habilidad de moverse espontáneamente e independientemente. Se puede aplicar tanto a organismos unicelulares como a multicelulares ⁽¹⁸⁾

Termófilo: es un subtipo de organismo que crece a temperaturas relativamente altas, por encima de los 45°C ⁽¹¹⁾.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO Nº 1
FORMATO DE ENTREVISTA A LABORATORIOS ACREDITADOS



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

ENTREVISTA A LABORATORIOS QUE SE ENCUENTRAN ACREDITADOS EN EL PAÍS QUE REALIZAN ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS A MEDICAMENTOS.

Objetivo: Conocer la importancia que tiene un manual de procedimientos en un laboratorio de control de Calidad Microbiológico de Medicamentos y la acreditación de los procedimientos.

NOMBRE DEL LABORATORIO: _____

DIRECCIÓN: _____

NOMBRE DEL ENTREVISTADO: _____

CARGO DENTRO DEL
LABORATORIO: _____

1. ¿Considera indispensable la acreditación de los ensayos realizados a los medicamentos No Estériles?

Si _____ No _____

2. ¿El laboratorio cuenta con la acreditación de los procedimientos microbiológicos realizados a los medicamentos?

Si _____ No _____

3. ¿Qué procedimientos de análisis se encuentran acreditados?

4. ¿A que tipo de instituciones prestan sus servicios analíticos?

5. ¿Realizan análisis a instituciones internacionales? ¿cuáles?

6. ¿Cuánto tiempo llevo efectuar el proceso para obtener el reconocimiento de acreditación?

7. ¿Qué ventajas y/o desventajas ha presentado el laboratorio desde que obtuvo su acreditación?

8. ¿Cuenta el laboratorio con manual de procedimientos para el análisis microbiológico de los medicamentos? ¿Desde cuando?

9. ¿Qué ventajas y/o desventajas ha presentado el laboratorio desde que cuenta con el manual de procedimientos?

10. ¿Considera que se tiene un mejor desempeño y agilización en la realización de los análisis al contar con el apoyo de un manual de procedimiento?

Si_____ No_____

11. ¿Tiene el personal de laboratorio fácil acceso a los manuales, instrucciones de trabajo, reglamentos y procedimientos de ensayo cuando tiene la necesidad de éstos?

Si_____ No_____

ANEXO N° 2
FORMATO DE PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS SEGÚN NORMA ISO/IEC
17025₍₁₀₎

| | | |
|---|--------------------------------------|----------------------|
|  Universidad de El Salvador <i>Aplica la libertad por la cultura</i> | PROCEDIMIENTO NORMALIZADO | Código: ALI-01-P.00 |
| | Nombre del procedimiento de análisis | Página de: |
| | | Vigente a partir de: |
| Elaborado por: | Revisado por: | Autorizado por |

- A. OBJETIVO: se detalla lo que se pretende con el procedimiento estándar.
- B. ALCANCE: tipo de muestra a la que va dirigido el análisis.
- C. TÉRMINO Y DEFINICIONES: se definen los principales conceptos y términos técnicos y científicos del procedimiento.
- D. POLITICA: son las actividades con las que el laboratorio se compromete para lograr la máxima calidad del procedimiento.
- E. RESPONSABILIDAD: se designa al responsable de la ejecución y supervisión a lo largo del procedimiento.
- F. REGISTROS DE CALIDAD: Se especifica la documentación necesaria para el registro de las muestras a analizar.
- G. DESARROLLO: comprende: Introducción, equipo y medios de cultivo, procedimiento, cálculo, criterios de aceptación, aseguramiento de la calidad, diagrama de flujo.
- H. BIBLIOGRAFIA Y/O DOCUMENTO DE REFERENCIA
- I. ANEXOS

ANEXO Nº 3

LABORATORIOS VISITADOS

Los laboratorios visitados que realizan análisis a medicamentos y que se encuentran acreditados fueron:

- Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC)
- Laboratorios de Especialidades Industriales (ESMI)

En el desarrollo de la entrevista se identificaron de la siguiente forma:

- Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC): L1
- Laboratorios de Especialidades Industriales (ESMI) : L2

ANEXO Nº 4

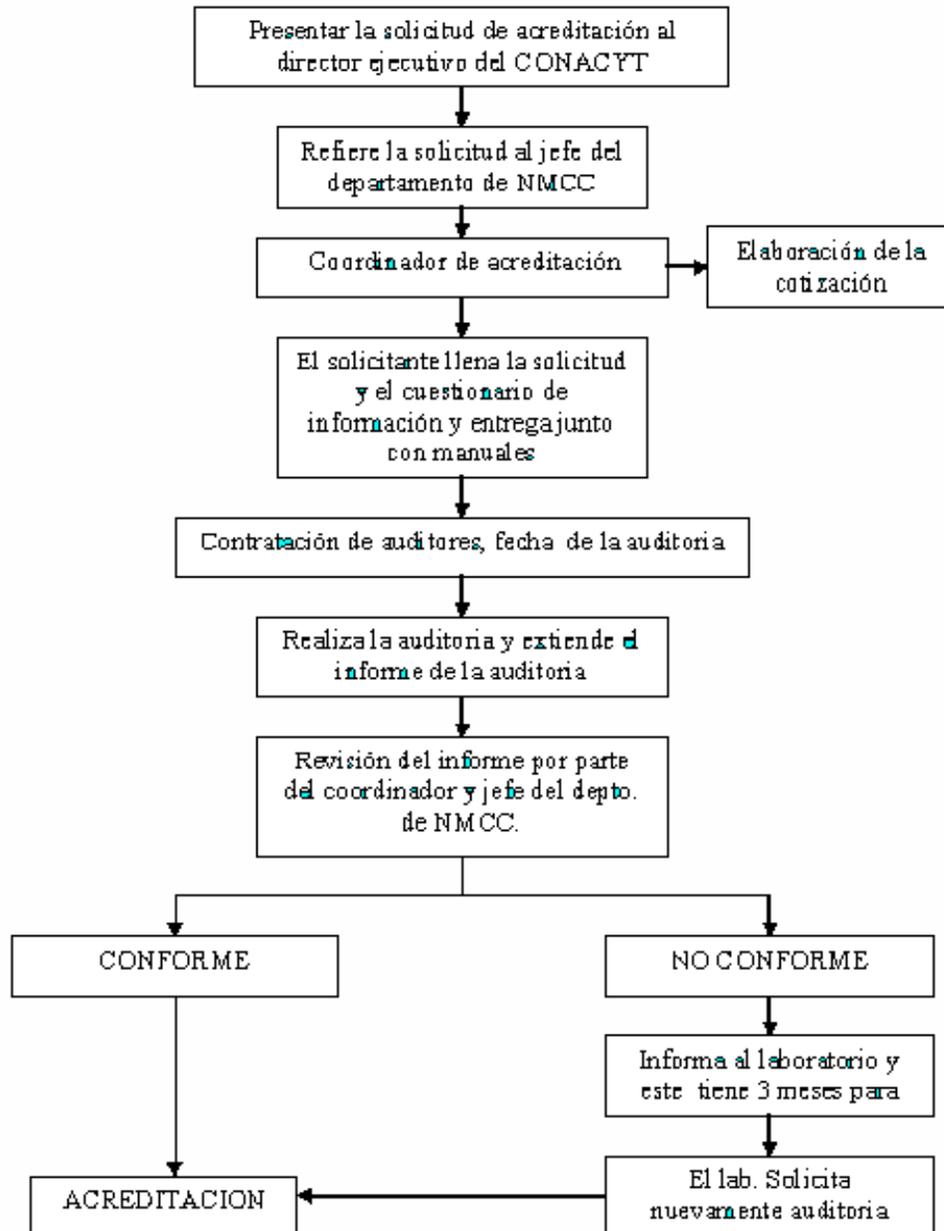


Figura Nº 1. Lineamientos para la acreditación

ANEXO Nº 5

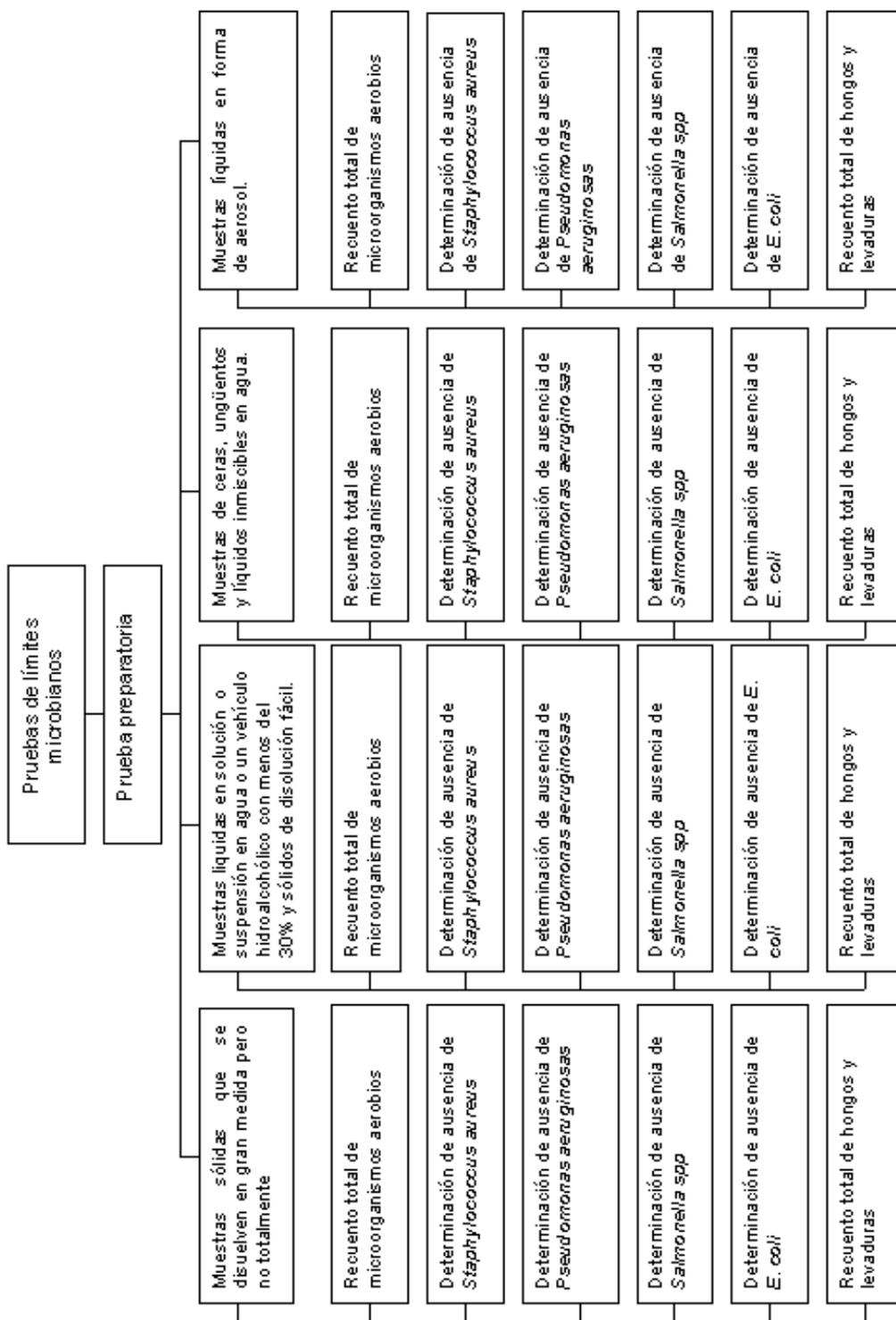


Figura Nº 2. Partes que conforman el manual de procedimientos microbiológicos de productos farmacéuticos no estériles.