

Legislación Nacional

var disURL = '1292390/1292665/1838937/de_202_2003_1.htm'; document.write("");]>DECRETO 202/2003

FARMACIA Farmacopea Argentina. Primer volumen de la séptima edición. Aprobación. Uso obligatorio Continuación del 12/06/2003; publ. 17/06/2003

Fenol Solución del estándar interno: Transferir 1 ml de alcohol bencílico a un matraz aforado de 500 ml, completar con metanol a volumen y mezclar. Preparación estándar: Transferir aproximadamente 75 mg de fenol, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 7,5 ml de metanol y agregar 20,0 ml de solución del estándar interno. Completar con agua a volumen y mezclar. Procedimiento: Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 3 ml) de la Preparación estándar y la Preparación muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de fenol y de alcohol bencílico en el cromatograma de la Preparación estándar, designándolos P1 y P2, respectivamente. Del mismo modo, determinar los valores correspondientes a p1 y p2, para la Preparación muestra. Calcular el contenido de fenol (C₆H₆O), en mg por ml, en la muestra, por la fórmula siguiente: $100 (C/V) (p1/p2) (P2/P1)$ En la cual C es la concentración, en mg por ml, de fenol en la Preparación estándar y V es el volumen de muestra, en ml, empleado para preparar 100 ml de la Preparación muestra.

Metilparabeno y propilparabeno Solución del estándar interno: Transferir aproximadamente 200 mg de benzofenona a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con éter y mezclar. Preparación estándar: Transferir 100 mg de metilparabeno y 10 mg de propilparabeno, exactamente pesados, a un matraz aforado de 200 ml, diluir a volumen con solución del estándar interno y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un erlenmeyer de 25 ml y proceder según se indica para la Preparación muestra, comenzando donde dice "Agregar 3 ml de piridina". Preparación muestra: Transferir 10 ml de muestra y 10 ml de solución del estándar interno a una ampolla de decantación. Agitar y dejar que las fases se separen. Transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de decantación y la fase etérea a un erlenmeyer a través de un embudo que contenga sulfato de sodio anhidro. Extraer la fase acuosa con dos porciones de 10 ml de éter y filtrar los extractos a través de sulfato de sodio anhidro. Evaporar los extractos combinados bajo una corriente de aire seco hasta que el volumen se reduzca a 10 ml aproximadamente. Transferir el residuo obtenido a un erlenmeyer de 25 ml. Agregar 3 ml de piridina, completar la evaporación del éter y calentar a ebullición sobre una placa calefactora hasta que el volumen se reduzca a 1 ml aproximadamente. Enfriar y agregar 1,0 ml de un agente silanizante apropiado, como hexametildisilazano al cual se le ha agregado trimetilclorosilano, bis(trimetilsilil)acetamida, o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. Mezclar y dejar reposar durante no menos de 15 minutos. Procedimiento: Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 ml) de la solución silanizada de la Preparación estándar y la solución silanizada de la Preparación muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de metilparabeno, propilparabeno y benzofenona, designándolas P1, P2 y P3, respectivamente. Del mismo modo, determinar los valores correspondientes a p1, p2 y p3, para la solución silanizada de la Preparación muestra. Calcular el contenido, en mg por ml, de metilparabeno (C₈H₈O₃) en la muestra, por la fórmula siguiente: $10 (CM/V) (p1/p3) (P3/P1)$ En la cual CM, es la concentración, en mg por ml, de metilparabeno en la Preparación estándar y V es el volumen de muestra tomado, en ml. Calcular el contenido, en mg por ml, de propilparabeno (C₁₀H₁₂O₃) en la muestra, por la fórmula siguiente: $10 (Cp/V) (p2/p3) (P3/P2)$ En la cual Cp es la concentración, en mg por ml, de propilparabeno en la Preparación estándar. El etilparabeno y el butilparabeno pueden determinarse del mismo modo.

Método polarográfico Nitrato fenilmercúrico Preparación estándar: Transferir aproximadamente 100 mg de nitrato fenilmercúrico, exactamente pesados, a un matraz aforado de 1 litro, disolver en solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y calentar, si fuera necesario, para disolver. Completar a volumen con solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y proceder según se indica en "Preparación muestra", comenzando donde dice "agregar 2 ml de solución de nitrato de potasio (1 en 100)". Preparación muestra: Transferir 10 ml de muestra a un matraz aforado de 25 ml, agregar 2 ml de solución de nitrato de potasio (1 en 100) y 10 ml de solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 (ver "Soluciones reguladoras" en "Reactivos y soluciones") y ajustar a pH 9,2, si fuera necesario, con ácido nítrico 2 N. Agregar 1,5 ml de una solución de gelatina (1 en 1000) recientemente preparada, completar a volumen con solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 y mezclar. Procedimiento (ver 700, "Polarografía"): Transferir una porción de Preparación muestra a la celda polarográfica y desairear mediante el burbujeo de nitrógeno en la solución durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,6 a -1,5 voltios contra un electrodo de calomel saturado. Determinar la corriente de difusión de la Preparación muestra, (id)D como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión, (id)E de la Preparación estándar. Calcular la cantidad, en mg, de nitrato fenilmercúrico (C₆H₅HgNO₃) en cada ml de muestra tomada, por la fórmula siguiente: $2,5 C [(id)D/(id)E]$ En la cual C es la concentración, en mg por ml de nitrato fenilmercúrico en la Preparación estándar y los otros términos son los definidos anteriormente.

Tiomersal Preparación estándar: En el día del ensayo, transferir aproximadamente 25 mg de tiomersal, exactamente pesados, a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con agua y

mezclar. Nota: Proteger esta solución de la luz. Transferir 15 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1,5 ml de solución de gelatina (1 en 1000), completar a volumen con solución de nitrato de potasio (1 en 100) y mezclar. Preparación muestra: Transferir 15 ml de muestra a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1,5 ml de solución de gelatina (1 en 1000), completar a volumen con solución de nitrato de potasio (1 en 100) y mezclar. Procedimiento (ver 700, "Polarografía"): Transferir una porción de Preparación muestra a una celda polarográfica y desairear mediante el burbujeo de nitrógeno en la solución durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,2 a -1,4 voltios contra electrodo de calomel saturado. Determinar la corriente de difusión, (id)D como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión (id)E de la Preparación estándar. Calcular la cantidad, en mg, de tiomersal (C₀H₉HgNaO₂S) en cada ml de muestra tomada, por la fórmula siguiente: $1,667 C [(id)D/(id)E]$ En la cual C es la concentración, en mg por ml, de tiomersal en la Preparación estándar y los otros términos son los definidos anteriormente.

90. CONTROL HIGIÉNICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES En este capítulo se especifican los ensayos necesarios para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes y para determinar la ausencia de ciertas especies microbianas en cualquier tipo de materia prima o producto farmacéutico. A menos que se especifique de otro modo, el término incubar implica colocar el recipiente en aire termostáticamente controlado a una temperatura entre 30 y 35°C durante un período de 24 a 48 horas.

Ensayos preliminares La validez de los resultados de los ensayos incluidos en este capítulo depende, en gran medida, de que se demuestre apropiadamente que las muestras sometidas a las condiciones del ensayo no inhiben la multiplicación de los microorganismos que pudieran estar presentes. Efectividad de los medios de cultivo y validez del método de recuento: Diluir, de acuerdo a la técnica a validar, la muestra en solución reguladora de fosfato pH 7,2. Agregar separadamente diluciones de cultivos de 24 horas de "Staphylococcus aureus", "Escherichia coli", "Pseudomonas aeruginosa" y Salmonella de modo que, en las placas de recuento, siguiendo el método en estudio, el número de ufc hallado sea entre 30 y 300. Controlar el método de recuento, siguiendo el procedimiento correspondiente, en presencia y ausencia de la muestra a ensayar. El recuento de los microorganismos ensayados con la muestra no debe diferir en más de un factor de 5 con respecto al valor obtenido en ausencia de la misma. Propiedades nutritivas y selectivas de los medios y validez del ensayo para los microorganismos especificados: Inocular separadamente las muestras diluidas del producto a ensayar con cultivos viables de "Staphylococcus aureus", "Escherichia coli", "Pseudomonas aeruginosa" y "Salmonella". Agregar 1 ml de una dilución no menor de 10⁻³ de un cultivo de 24 horas del microorganismo en solución reguladora de fosfato pH 7,2, caldo digerido de caseína-soja o caldo lactosado, a la primera dilución del producto a ensayar y seguir el procedimiento seleccionado. La ausencia de crecimiento de alguno de los microorganismos ensayados en el medio correspondiente indica una inhibición del desarrollo por parte del producto y requiere una modificación en el procedimiento a través de (1) un aumento en el volumen del diluyente manteniéndose la misma cantidad del material a ensayar; (2) la incorporación de una cantidad suficiente de un agente inactivante apropiado en el diluyente, como por ej., lecitina de soja al 0,5% y/o Polisorbato 20 al 4,0%; (3) una combinación de las modificaciones (1) y (2) a fin de favorecer el desarrollo del inóculo. Alternativamente, se puede repetir el ensayo anteriormente descrito empleando caldo digerido de caseína-soja-polisorbato 20 para neutralizar conservantes u otros agentes antimicrobianos presentes en el producto a ensayar. Si a pesar de la incorporación de agentes inactivantes apropiados y de un aumento considerable del volumen del diluyente, aun no fuera posible recuperar los cultivos viables o cuando el producto no resulta apropiado para el empleo del Método de filtración por membrana (ver 370, "Ensayos de esterilidad"), se podrá asumir que la falla en no aislar los microorganismos inoculados es atribuible a las propiedades inhibitorias del producto. Esta información indica que es probable que el producto no se contamine con los microorganismos ensayados. En estos casos se debe continuar efectuando ensayos con el fin de establecer el espectro de inhibición y la actividad bactericida del producto.

Solución reguladora y medios de cultivo Los medios de cultivo pueden prepararse según se indica a continuación o pueden emplearse medios de cultivo deshidratados que al ser reconstituidos según las indicaciones del elaborador, produzcan medios comparables a los obtenidos por las fórmulas que aquí se indican. Determinar el pH a 25 +/- 2°C. Al preparar el medio de cultivo con las fórmulas aquí indicadas, se deben disolver los sólidos solubles en agua, empleando calor si fuera necesario, para obtener la disolución total y agregar soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades suficientes hasta alcanzar el pH deseado. Si en una fórmula se indica agar, emplear uno con un contenido de humedad menor o igual a 15%. Cuando se indica agua, emplear agua.

Solución reguladora de fosfato pH 7,2: Transferir 34 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz aforado de 1 litro y disolver en aproximadamente 500 ml de agua. Agregar aproximadamente 175 ml de hidróxido de sodio (S.R.) para ajustar a pH 7,2 +/- 0,1, completar a volumen con agua y mezclar. Fraccionar y esterilizar. Almacenar en un ambiente refrigerado. Al momento de uso, diluir esta solución con agua en una proporción de 1 en 800 y esterilizar.

Medios de cultivo A menos que se especifique de otro modo, los medios se deben esterilizar en autoclave. El tiempo de exposición dependerá del volumen a esterilizar.

I. Caldo Digerido de Caseína-Soja-Polisorbato 20 Digerido pancreático de caseína: 20,0 g. Lecitina de soja: 5,0 g. Polisorbato 20: 40 ml. Agua:

960 ml. Disolver el digerido pancreático de caseína y la lecitina de soja en el agua, calentando en un baño termostático, a una temperatura entre 48 y 50°C, durante aproximadamente 30 minutos, hasta lograr la disolución. Agregar 40 ml de polisorbato 20, mezclar y fraccionar.

II. Agar Digerido de Caseína-Soja Digerido pancreático de caseína: 15,0 g. Digerido papaínico de harina de soja: 5,0 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Agar: 15,0 g. Agua: 100 ml. pH después de la esterilización: 7,3 +/- 0,2.

III. Caldo Digerido de Caseína-Soja Preparar según se indica para caldo digerido de Caseína-Soja en 370. Ensayos de esterilidad.

IV. Agar Manitol-Sal Digerido pancreático de caseína: 5,0 g. Digerido péptico de tejido animal: 5,0 g. Extracto de carne vacuna: 1,0 g. D-Manitol: 10,0 g. Cloruro de sodio: 75,0 g. Agar: 15,0 g. Rojo de fenol: 0,025 g. Agua 1000 ml. Mezclar y luego calentar, agitando frecuentemente. Calentar a ebullición durante 1 minuto hasta lograr la disolución. pH después de la esterilización: 7,4 +/- 0,2.

V. Agar Baird-Parker Digerido pancreático de caseína: 10,0 g. Extracto de carne vacuna: 5,0 g. Extracto de levadura: 1,0 g. Cloruro de litio: 5,0 g. Agar: 20,0 g. Glicina: 12,0 g. Piruvato de sodio: 10,0 g. Agua: 950 ml. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar y dejar enfriar a una temperatura entre 45 y 50°C. Agregar 10 ml de solución estéril de telurito de potasio (1 en 100) y 50 ml de emulsión de yema de huevo. Mezclar suavemente evitando la formación de espuma, hasta obtener una mezcla homogénea y transferir a las placas. Nota: Para preparar la emulsión de yema de huevo desinfectar la totalidad de la superficie de las cáscaras de los huevos. Romper las cáscaras asépticamente, separar las yemas, en forma intacta y colocarlas en una probeta estéril. Agregar solución fisiológica (S.R.) estéril hasta obtener una proporción de yema/solución fisiológica de 3 a 7. Transferir a un vaso estéril de una mezcladora y mezclar a alta velocidad durante 5 segundos. pH después de la esterilización: 6,8 +/- 0,2.

VI. Agar Vogel-Johnson Digerido pancreático de caseína: 10,0 g. Extracto de levadura: 5,0 g. Manitol: 10,0 g. Fosfato dibásico de potasio: 5,0 g. Cloruro de litio: 5,0 g. Glicina: 10,0 g. Agar: 16,0 g. Rojo de fenol: 25,0 mg. Agua 1000 ml. Calentar a ebullición la solución constituida por todos los componentes durante 1 minuto. Esterilizar, enfriar a una temperatura entre 45 y 50°C y agregar 20 ml de solución estéril de telurito de potasio (1 en 100). pH después de la esterilización: 7,2 +/- 0,2.

VII. Agar Cetrimida Digerido pancreático de gelatina: 20,0 g. Cloruro de magnesio: 1,4 g. Sulfato de potasio: 10,0 g. Agar: 13,6 g. Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetrimida): 0,3 g. Glicerina: 10,0 ml. Agua 1000 ml. Disolver los componentes sólidos en agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución. pH después de la esterilización: 7,2 +/- 0,2.

VIII. Agar Pseudomonas para la detección de Fluorescina Digerido pancreático de caseína: 10,0 g. Digerido péptico de tejido animal: 10,0 g. Fosfato dibásico de potasio anhidro: 1,5 g. Sulfato de magnesio (MgSO₄ · 7H₂O): 1,5 g. Glicerina: 10,0 ml. Agar: 15,0 g. Agua: 1000 ml. Disolver los componentes sólidos en el agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución. pH después de la esterilización: 7,2 +/- 0,2.

IX. Agar Pseudomonas para la detección de Piocianina Digerido pancreático de gelatina: 20,0 g. Cloruro de magnesio anhidro: 1,4 g. Sulfato de potasio anhidro: 10,0 g. Agar: 15,0 g. Glicerina: 10,0 ml. Agua 1000 ml. Disolver los componentes sólidos en el agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución. pH después de la esterilización: 7,2 +/- 0,2.

X. Caldo Lactosado Extracto de carne vacuna: 3,0 g. Digerido pancreático de gelatina: 5,0 g. Lactosa: 5,0 g. Agua 1000 ml. Enfriar lo más rápidamente posible después de la esterilización. pH después de la esterilización: 6,9 +/- 0,2.

XI. Caldo Selenito-Cistina Digerido pancreático de caseína: 5,0 g. Lactosa: 4,0 g. Fosfato de sodio: 10,0 g. Selenito ácido de sodio: 4,0 g. L-Cistina: 10,0 mg. Agua 1000 ml. Mezclar calentar hasta disolución. Calentar a vapor fluente durante 15 minutos. No esterilizar. pH final: 7,0 +/- 0,2.

XII. Caldo Tetrionato Digerido pancreático de caseína: 2,5 g. Digerido péptico de tejido animal: 2,5 g. Sales biliares: 1,0 g. Carbonato de calcio: 10,0 g. Tiosulfato de sodio: 30,0 g. Agua 1000 ml. Calentar la solución constituida por todos los componentes a ebullición. No esterilizar. En el día de su uso, agregar una solución de 5 g de yoduro de potasio y 6 g de yodo en 20 ml de agua.

XIII. Agar Verde Brillante Extracto de levadura: 3,0 g. Digerido péptico de tejido animal: 5,0 g. Digerido pancreático de caseína: 5,0 g. Lactosa: 10,0 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Sacarosa: 10,0 g. Rojo de fenol: 80 mg. Agar: 20,0 g. Verde brillante: 12,5 mg. Agua 1000 ml. Calentar a ebullición la solución constituida por todos los sólidos durante 1 minuto. Antes de su uso, esterilizar, fundir el medio y verter en las placas de Petri. Dejar enfriar. pH después de la esterilización: 6,9 +/- 0,2.

XIV. Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato Xilosa: 3,5 g. L-Lisina: 5,0 g. Lactosa: 7,5 g. Sacarosa: 7,5 g. Cloruro de sodio: 5,0 g. Extracto de levadura: 3,0 g. Rojo de fenol: 80 mg. Agar: 13,5 g. Desoxicolato de sodio: 2,5 g. Tiosulfato de sodio: 6,8 g. Citrato amónico férrico: 800 mg. Agua 1000 ml. Calentar la mezcla de los sólidos con el agua, agitando por rotación hasta llegar al punto de ebullición. No sobrecalear ni esterilizar. Transferir de inmediato a un baño de agua a 50°C y verter en las placas tan pronto como el medio se haya enfriado. pH final: 7,4 +/- 0,2.

XV. Agar Sulfito de Bismuto Extracto de carne vacuna: 5,0 g. Digerido pancreático de caseína: 5,0 g. Digerido péptico de tejido animal: 5,0 g. Dextrosa: 5,0 g. Fosfato de sodio: 4,0 g. Sulfato ferroso: 300 mg. Indicador de sulfito de bismuto: 8,0 g. Agar: 20,0 g. Verde brillante: 25 mg. Agua 1000 ml. Calentar la mezcla de los sólidos con el agua, agitando por rotación hasta llegar al punto de ebullición. No sobrecalear ni esterilizar. Transferir de inmediato a un baño de agua 50°C y verter en las placas tan pronto como el medio se haya enfriado. pH final: 7,6 +/- 0,2.

XVI. Agar Triple Azúcar-Hierro Digerido pancreático de caseína: 10,0 g. Digerido pancreático de tejido animal: 10,0 g. Lactosa: 10,0 g. Sacarosa: 10,0

g.Dextrosa: 1,0 g.Sulfato ferroso amónico: 200 mg.Cloruro de sodio: 5,0 g.Tiosulfato de sodio: 200 mg.Agar: 13,0 g.Rojo de fenol: 25 mg.Agua 1000 ml.pH después de esterilización: 7,3 +/- 0,2.XVII. *Agar Mac Conkey*Digerido pancreático de gelatina: 17,0 g.Digerido pancreático de caseína: 1,5 g.Digerido péptico de tejido animal: 1,5 g.Lactosa: 10,0 g.Mezcla de sales biliares: 1,5 g.Cloruro de sodio: 5,0 g.Agar: 13,5 g.Rojo neutro: 30 mg.Cristal violeta: 1,0 mg.Agua 1000 ml.Calentar la mezcla de todos los componentes y el agua hasta ebullición y seguir calentando durante 1 minuto para facilitar la disolución.pH después de la esterilización: 7,1 +/- 0,2.XVIII. *Agar Levine Eosina-Azul de Metileno*Digerido pancreático de gelatina: 10,0 g.Fosfato-dibásico de potasio: 2,0 g.Agar: 15,0 g.Lactosa: 10,0 g.Eosina: 400 mg.Azul de metileno: 65 mg.Agua 1000 ml.Disolver mediante calentamiento el digerido pancreático de gelatina, el fosfato dibásico de potasio y el agar en el agua y dejar enfriar. Inmediatamente antes de usar, fundir el gel de agar mediante calentamiento y agregar, por cada 100 ml de la solución de agar fundido, 5 ml de solución de lactosa (1 en 5), 2 ml de solución de eosina (1 en 50) y 2 ml de la solución de azul de metileno (1 en 300). Mezclar.Nota: El medio final puede no ser transparente.pH después de la esterilización: 7,1 +/- 0,2.XIX. *Agar Sabouraud-Dextrosa*Dextrosa: 40,0 g.Mezcla de partes iguales de digerido péptico de tejido animal y digerido pancreático de caseína: 10,0 g.Agar: 15,0 g.Agua 1000 ml.Mezclar y calentar a ebullición para facilitar la disolución.pH después de la esterilización: 5,6 +/- 0,2.XX. *Agar Papa-Dextrosa*Cocer 300 g de papas peladas, cortadas en rodajas, en 500 ml de agua. Filtrar a través de gasa, agregar agua en cantidad suficiente para obtener 1000 ml y agregar:Agar: 15,0 g.Glucosa: 20,0 g.Disolver por calentamiento y esterilizar.pH después de la esterilización: 5,6 +/- 0,2.Inmediatamente antes de verter en las placas, ajustar el medio fundido y enfriado a 45°C con solución estéril de ácido tartárico (1 en 10) a pH 3,5 +/- 0,1. No volver a calentar el medio de pH 3,5.XXI. *Agar D.R.B.C. (Dicloran-Rosa de Bengala-Cloranfenicol)* Glucosa: 10,0 g.Peptona: 5,0 g.Fosfato dibásico de potasio: 1,0 g.Sulfato de magnesio (MgSO₄: 7H₂O): 0,5 g.Cloruro de diclorobenzalconio (Dicloran): 2 mg.Agar: 15,0 g.Cloranfenicol: 100 mg.Rosa de bengala: 25,0 mg.Agua 1000 ml.Disolver los componentes sólidos en agua. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente, para facilitar la disolución.pH después de la esterilización: 5,6 +/- 0,2.XXII. *Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa*Peptona de carne: 7,0 g.Extracto de levadura: 3,0 g.Cloruro de sodio: 5,0 g.Glucosa: 10,0 g.Mezcla de sales biliares: 1,5 g.Rojo Neutro: 0,03 g.Cristal violeta: 0,002 g.Agar: 13,0 g.Agua 1000 ml.Disolver y calentar durante 30 minutos a vapor fluente. No esterilizar en autoclave.pH final: 7,3 +/- 0,1.XXIII. *Caldo de Enriquecimiento de Mossel para Enterobacterias*Digerido pancreático de gelatina: 10,0 g.Glucosa (C₆H₁₂O-H₂O): 5,0 g.Bilis de buey deshidratada: 20,0 g.Fosfato monobásico de potasio: 2,0 g.Fosfato dibásico de potasio dihidratado: 8,0 g.Verde brillante: 15 mg.Agua 1000 ml.Ajustar el pH de manera que, después del calentamiento, sea de 7,2 +/- 0,2. Calentar a 100°C durante 30 minutos y enfriar inmediatamente.XXIV. *Medio Tioglicolato*Preparar según se indica para Medio Tioglicolato en 370, "Ensayos de esterilidad".XXV. *Agar sulfito-Polimixina-sulfadiacina*Peptona de caseína: 15,0 g.Extracto de levadura: 10,0 g.Citrato férrico: 0,5 g.Sulfito de sodio: 0,5 g.Polimixina B sulfato: 0,01 g.Sulfadiacina sódica: 0,12 g.Agar: 13,9 g.Agua 1000 ml.pH después de la esterilización: 7,0 +/- 0,2.Disolver por calentamiento y esterilizar en autoclave.**Muestreo**Tomar porciones de 10 ml o 10 g para preparar la muestra a ensayar.**Procedimiento**Preparar la muestra a ensayar mediante un tratamiento que se ajuste a sus características físicas y que no altere el número y tipo de microorganismos originalmente presentes, a fin de obtener una solución o suspensión apropiada.En el caso de sólidos que no se disuelven por completo, reducir la muestra a polvo moderadamente fino. Suspender en el vehículo especificado y proceder según se indica en "Recuento de aerobios viables", "Ensayo para Staphylococcus aureus" y Pseudomonas aeruginosa" y "Ensayo para Salmonella spp." y Escherichia coli" ".En el caso de líquidos, soluciones verdaderas, suspensiones en agua o en un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30% de alcohol y en el caso de un sólido que se disuelve en solución reguladora de fosfato pH 7,2 o en el medio especificado, proceder según se indica "Recuento de aerobios viables", "Ensayo para Staphylococcus aureus" y Pseudomonas aeruginosa" y "Ensayo para Salmonella spp." y Escherichia coli" ".En el caso de líquidos no miscibles en agua, como ungüentos, cremas y ceras, preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril apropiado (como por ej., un polisorbato), mezclar y calentar a una temperatura menor o igual a 45°C, si fuera necesario, y proceder según se indica en "Recuento de aerobios viables", "Ensayo para Staphylococcus aureus" y Pseudomonas aeruginosa" y "Ensayo para Salmonella spp." y Escherichia coli" ".En el caso de aerosoles líquidos, enfriar el recipiente en una mezcla de hielo seco y alcohol durante aproximadamente 1 hora. Cortar el recipiente, dejar que alcance la temperatura ambiente. Dejar evaporar el propelente o calentar suavemente, si fuera posible, y transferir la cantidad de producto a ensayar siguiendo alguno de los procedimientos especificados anteriormente. En caso que no fuera posible obtener 10,0 g o 10,00 ml de muestra, a partir de diez aerosoles, transferir el contenido total de diez envases enfriados al medio de cultivo, dejar evaporar el propelente y realizar el ensayo sobre los residuos. Si los resultados de los ensayos resultaran dudosos o no concluyentes, repetir el ensayo sobre veinte envases adicionales.**Recuento de aerobios viables**En el caso de muestras que sean lo suficientemente solubles o traslúcidas para permitir el procedimiento en placa, emplear dicho método. En caso contrario, emplear el procedimiento en tubo. Con cualquiera de los dos métodos, disolver o suspender 10,0 g de muestra, si fuera sólida, o 10,0 ml,

exactamente medidos, si fuera un líquido, en solución reguladora de fosfato pH 7,2, Caldo Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja-Polisorbato 20 para obtener 100 ml. Para muestras que no pudieran ser pipeteadas a esta dilución inicial de 1:10, diluirlas hasta obtener una suspensión que pueda ser pipeteada, como por ej., 1:50 o 1:100, etc. Realizar el ensayo de ausencia de propiedades inhibitorias según se indica en “Ensayos preliminares antes de la determinación del recuento de aerobios viables”. Las diluciones así preparadas no deben dejarse más de 1 hora antes de proseguir con el ensayo. Procedimiento en placa: Realizar una dilución, si fuera necesario, de modo que 1 ml contenga entre 30 y 300 ufc. Transferir 1 ml de la dilución final a cada una de dos placas de Petri estériles. Agregar rápidamente a cada placa entre 15 y 20 ml del Agar Digerido de Caseína-Soja previamente fundido y enfriado a 45°C. Tapar las placas de Petri, homogeneizar la muestra con el agar por rotación de las placas y dejar solidificar a temperatura ambiente. Invertir las placas de Petri e incubar durante 48 a 72 horas. Luego de la incubación, examinar las placas para ver si hubo desarrollo. Contar el número de colonias y expresar el promedio para las dos placas en términos del número de unidades formadoras de colonias por g (ufc/g) o por ml de muestra (ufc/ml). Si no se detectan colonias en las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como menos de 10 ufc por g o por ml de muestra. Procedimiento en tubo: Agregar a cada uno de catorce tubos de ensayo de tamaño similar, 9,0 ml de Caldo Digerido de Caseína-Soja estéril. Distribuir doce de los tubos en cuatro grupos de tres tubos cada uno. El grupo de los tres tubos restantes servirá de control. Transferir 1 ml de la solución o suspensión de la muestra a cada uno de los tres tubos de un grupo (“100”) y a un cuarto tubo (A) y mezclar. Transferir 1 ml del contenido del tubo A, al tubo restante (B) no incluido en ningún grupo y mezclar. Estos dos tubos contienen 100 mg (o 100 µl) y 10 mg (o 10 µl) de la muestra, respectivamente. Transferir 1 ml del contenido del tubo a cada uno de los tres tubos del segundo grupo (“10”) y 1 ml del contenido del tubo B a cada uno de los tubos del tercer grupo (“1”). Descartar el contenido remanente de los tubos A y B. Tapar bien e incubar todos los tubos. Luego del período de incubación, examinar los tubos para detectar desarrollo bacteriano: Los tres tubos controles deben permanecer transparentes y los tubos que contienen la muestra deben compararse con la tabla 1. **Ensayo para “Staphylococcus aureus” y “Pseudomonas aeruginosa”** A un volumen de la dilución preparada en “Recuento de aerobios viables”, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Digerido de Caseína-Soja para obtener 100 ml, mezclar e incubar. Examinar el medio para detectar desarrollo bacteriano y, si lo hubiera, inocular con un ansa la superficie de Agar Vogel-Johnson (o Agar Baird-Parker o Agar Manitol-Sal) y de Agar Cetrimida. Tapar, invertir las placas e incubar. Si ninguna de las placas contiene colonias con las características descritas en la tabla 2 y en la tabla 3 para los medios empleados, la muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de “Staphylococcus aureus” y de “Pseudomonas aeruginosa” por gramo o mililitro. **Ensayo para “Staphylococcus aureus”:** Transferir a tubos individuales 0,5 ml de plasma de mamífero, preferentemente conejo o caballo, con o sin aditivos apropiados. Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir a sendos tubos una porción representativa de cada una de las colonias sospechosas de la superficie del Agar Vogel-Johnson (o Agar Baird-Parker o Agar Manitol-Sal), catalasa positivas. Incubar en un baño de agua a 37°C, durante 3 horas y observar. Posteriormente y a intervalos apropiados, observar hasta que hayan transcurrido 24 horas. Efectuar, en paralelo con la muestra, centro positivos y negativos. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de “Staphylococcus aureus” por gramo o mililitro si no se observa ningún grado de coagulación. La presencia de “Staphylococcus aureus” puede ser confirmada por otros ensayos bioquímicos apropiados. **Ensayo para “Pseudomonas aeruginosa”:** Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir una porción representativa de cada una de las colonias sospechosas de la superficie del Agar Cetrimida a la superficie de Agar Pseudomonas para la Detección de Fluorescina y de Agar Pseudomonas para la Detección de Piocianina. Tapar e invertir los medios inoculados e incubar a 35 +/- 2°C durante no menos de 3 días. Examinar las superficies inoculadas bajo luz ultravioleta y determinar si las colonias poseen las características descritas en la tabla 3. Confirmar la presencia de “Pseudomonas aeruginosa” en cualquier colonia sospechosa que se haya desarrollado en uno o más de los medios, por ensayos bioquímicos apropiados. Transferir las colonias a tiras o discos de papel de filtro previamente impregnados con diclorhidrato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina: La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de “Pseudomonas aeruginosa” por gramo o mililitro si no desarrolla un color rosado, que más tarde se torna púrpura. La presencia de “Pseudomonas aeruginosa” puede ser confirmada por otros ensayos bioquímicos apropiados. **Ensayo para “Salmonella” spp. y “Escherichia coli”** A un volumen de la dilución preparada en “Recuento de aerobios viables”, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Lactosado para obtener 100 ml, mezclar e incubar. Observar el medio. Si se detecta desarrollo bacteriano mezclar suavemente y transferir porciones de 1 ml a tubos que contengan respectivamente, 10 ml de Caldo Selenito-Cistina y 10 ml Caldo Tetrionato, mezclar e incubar durante un período de 12 a 24 horas (conservar el Caldo Lactosado remanente). **Ensayo para Salmonella spp:** Mediante el empleo de un ansa de inoculación, transferir porciones de los medios de selenito-cistina y de tetrionato, a las superficies de Agar Verde Brillante, Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato y Agar Sulfito de Bismuto. Tapar, invertir las placas e incubar. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de Salmonella spp. por gramo o mililitro si no se observa el desarrollo de colonias con las características

descriptas en la tabla 4. Si al menos en uno de los medios se encuentran colonias de bacilos Gram negativos que coincidan con las descriptas en la tabla 4, realizar un ensayo adicional, transfiriendo individualmente cada una de las colonias sospechosas, mediante un ansa de inoculación a un tubo que contenga Agar Triple Azúcar-Hierro solidificado con una superficie inclinada y un fondo, inoculándose la superficie primero y luego el fondo por punción. Incubar los tubos. Si no se observara reacción alcalina (color rojo) sobre la superficie y ácida (color amarillo) en el fondo (con o sin ennegrecimiento concomitante del fondo, producido por la formación de ácido sulfhídrico), la muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia del género Salmonella. La presencia o ausencia de Salmonella puede ser confirmada por ensayos bioquímicos apropiados. Ensayo para Escherichia coli: Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir una porción del Caldo Lactosado remanente sobre la superficie de Agar MacConkey. Tapar, invertir e incubar las placas. Si se observaran colonias como las descriptas en la tabla 5, realizar un ensayo adicional transfiriendo individualmente las colonias sospechosas, con la ayuda de un ansa de inoculación, a la superficie de Agar Levine Eosina-Azul de Metileno. Tapar, invertir e incubar las placas. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para la ausencia de "Escherichia coli" por gramo o mililitro si, ninguna de las colonias observadas presenta un brillo metálico característico frente a la luz reflejada y un aspecto negro azulado frente a la luz transmitida. La presencia de "Escherichia coli" puede ser confirmada por ensayos bioquímicos apropiados.

Ensayo para anaerobios sulfito-reductores A un volumen de la dilución preparada en "Recuento de aerobios viables", equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Medio Tioglicolato previamente calentado durante 10 minutos en un baño de vapor y enfriado, adicionado de azida sódica al 0,03%, hasta obtener 100 ml. Cubrir la superficie con una mezcla estéril de vaselina y parafina. Nota: La mezcla estéril de vaselina y parafina se prepara fundiendo 250 g de parafina conjuntamente con 750 g de vaselina, mezclando bien, repartiendo en tubos y esterilizando en autoclave. El medio inoculado y cubierto con la capa de vaselina-parafina se incuba entre 48 y 72 horas a 35°C. Si se observa desarrollo microbiano, transferir 1 ml a un tubo estéril de no más de 16 mm de diámetro exterior y no menos de 200 mm de largo. Agregar por las paredes, Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina, previamente fundido y enfriado a 40°C, hasta no más de 1 cm del borde superior del tubo. Cubrir con la mezcla de vaselina-parafina e incubar entre 5 y 7 días a 35°C, observando diariamente. La muestra cumple con el ensayo de ausencia de microorganismos anaerobios sulfito-reductores por gramo o mililitro si no se observa el desarrollo de colonias negras.

Gérmenes revivificables A un volumen de la dilución preparada en "Recuento de aerobios viables", equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Digerido de Caseína-Soja para obtener 100 ml. Incubar durante 5 días entre 25 y 28°C. A otro volumen de la dilución preparada en "Recuento de aerobios viables", equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Medio Tioglicolato hasta obtener 100 ml: Incubar entre 48 y 72 horas a 35°C. Observar ambos medios: La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de gérmenes revivificables en un gramo o mililitro si no se observa desarrollo microbiano.

Recuento de Enterobacteriaceae Procedimiento en placa: Proceder según se indica para Recuento de aerobios viables pero emplear agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-glucosa e incubar entre 48 y 72 horas. Luego de la incubación observar las placas para ver si hubo crecimiento. Contar el número de colonias rojas con halo de precipitación rojizo, de bacilos Gram negativos y expresar el promedio para las dos placas en términos del número de ufc de Enterobacteriaceae por g o ml de muestra. Si no se observan colonias características en las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como menos de 10 ufc por g o ml de muestra. Procedimiento en tubo: Inocular cantidades apropiadas de Caldo de Mossel para Enriquecimiento de Enterobacterias con la muestra preparada según se indica en "Procedimiento" o con diluciones de la misma que contengan respectivamente -0; 0,1 y 0,01 g o 1,0, 0,1 y 0,01 ml. Incubar. A partir de cada cultivo positivo subcultivar sobre agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-glucosa. Incubar entre 18 y 24 horas. La presencia de colonias rojas con halo de precipitación rojizo de bacilos Gram negativos constituye un resultado positivo. A partir de la tabla 6 determinar el número más probable de Enterobacteriaceae por g o ml de muestra.

Ensayo para Enterobacteriaceae: Disolver o suspender 10,0 g de muestra, si fuera sólida, o 10,0 ml, exactamente medidos, si fuera un líquido, en Caldo Lactosado hasta obtener 100 ml. Incubar entre 2 y 5 horas. Homogeneizar y transferir 10 ml de la muestra incubada a 90 ml de Caldo de Mossel para Enriquecimiento de Enterobacterias. Incubar entre 18 y 24 horas. Subcultivar sobre agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-glucosa e incubar. La muestra cumple con el ensayo para ausencia de Enterobacteriaceae por gramo o mililitro si no se observa desarrollo de colonias rojas con halo de precipitación rojizo de bacilos Gram negativos o si los ensayos bioquímicos son negativos.

Recuento de hongos y levaduras Proceder según se indica para el Procedimiento en placa en "Recuento de aerobios viables" pero emplear Agar Dextrosa-Sabouraud, Agar Papa-Dextrosa o Agar D.R.B.C. Incubar las placas de Petri, durante un período de 5 a 7 días, a una temperatura entre 20 y 25°C.

Reanálisis Con el propósito de confirmar un resultado dudoso en cualquiera de los procedimientos anteriormente descriptos para el análisis de una muestra de 10 g, el ensayo puede repetirse con una muestra de 25 g. Proceder según se indica en "Procedimiento", haciendo las modificaciones necesarias para adaptarlo a una muestra de mayor tamaño.

Asignación de límites El significado de la presencia de microorganismos en productos farmacéuticos no estériles, incluidos aquellos con límites especificados en la monografía correspondiente, debe ser evaluado teniendo en cuenta el uso del producto, su naturaleza, el riesgo

potencial para el paciente y el procesamiento. El contenido de microorganismos en una muestra, provee un índice general del grado de contaminación e información acerca del proceso de manufactura del elaborador. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, el recuento de microorganismos en materias primas debe ser 1000 ufc por g o ml para aerobios viables y 100 ufc por g o ml para hongos y levaduras. En el caso de productos terminados, los valores establecidos se basan en el tipo de forma farmacéutica y su vía de administración. Los límites de contenido microbiano para productos farmacéuticos no estériles en base a su vía de administración se indican en la tabla 7.

Tabla 1: Número más probable de microorganismos. Procedimiento en tubos

N. de tubos en los cuales se observa desarrollo		N. más probable de microorganismos por g o ml		100 mg o 100 ml por tubo																					
10 mg o 10 ml por tubo	1 mg o 1 ml por tubo	3	3	3	> 1100																				
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	120	3	1	1	70	3	1	0	40	3	0	3	95	3	0	2	60	3	0	1	40	3	0	0