



“2025, Año de la Mujer Indígena”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo y hasta el 30 de junio de 2025, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

APÉNDICE NUEVO

Dice	Debe decir	Justificación*
APÉNDICE. NORMATIVO. VALIDACIÓN DE RECUPERACIÓN MICROBIANA EN PRODUCTOS FARMACOPEICOS		
INTRODUCCIÓN		
Es una guía de validación de los métodos de recuperación para el cálculo del número de microorganismos viables, para la detección de microorganismos indicadores en los análisis microbiológicos como MGA 0571. Límites microbianos, MGA 0305. Efectividad de preservativos antimicrobianos, etc. Se consideran validados los métodos que provienen de alguna norma nacional o internacional. Sin embargo, el uso de los métodos normativos requiere el establecimiento de la aptitud del método, demostrando la recuperación de los microorganismos de prueba en presencia del producto. Los métodos alternativos o		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
modificaciones a estos métodos de recuperación como la dilución, neutralización química o enzimática y filtración por membrana, requieren ser validados. Se entiende por lo general que, si un producto tiene propiedades antimicrobianas debido a la presencia de un conservador específico o debido a su formulación, esta propiedad antimicrobiana debe ser neutralizada para recuperar los microorganismos viables. Esta neutralización se puede lograr utilizando un neutralizante específico, por dilución, combinando dilución, filtración y enjuague, o empleando una combinación de cualquiera de estos métodos. Cuando el producto presenta actividad antimicrobiana intrínseca para un microorganismo determinado y dada esta actividad antimicrobiana, el riesgo de contaminación microbiana es bajo, el método puede considerarse adecuado para el propósito de proporcionar una justificación sólida.		
FACTORES CONTRIBUYENTES		
Existen varios factores que afectan la determinación de la actividad antimicrobiana de una solución de prueba y deben considerarse en el diseño de validación. Éstos incluyen la naturaleza de los microorganismos de prueba, la preparación del inóculo, las condiciones específicas de los análisis y las condiciones de recuperación. Estos factores también afectan la validación de los métodos de recuperación para productos acuosos o no acuosos, independientemente de sus propiedades antimicrobianas. De este modo, todos		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
los métodos de análisis deben ser validados considerando estos factores.		
La naturaleza del microorganismo de prueba ejerce un gran efecto sobre la respuesta al agente antimicrobiano y, por lo tanto, sobre la neutralización requerida para la recuperación. Entre estos microorganismos en los métodos compéndiales, se encuentran bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, bacterias anaerobias, levaduras y hongos. Todos los microorganismos que se utilicen en el método de análisis deben ser incluidos en la validación.		
La preparación del inóculo de microorganismos de prueba también afecta el análisis de productos que tengan propiedades antimicrobianas. El cultivo y la preparación del microorganismo de prueba determina el estado fisiológico de la célula. Este estado influye directamente sobre los resultados de cualquier análisis de eficacia antimicrobiana. Los análisis microbiológicos no utilizan microorganismos individuales; se recolectan más bien poblaciones de microorganismos para su estudio. Los datos generados en estos estudios son menos variables si las poblaciones de microorganismos son homogéneas. Los cultivos líquidos o los cultivos en medios sólidos son más adecuados para la preparación de cultivos reproducibles. Las condiciones de preparación y almacenamiento del microorganismo deben ser estandarizadas para la evaluación del neutralizante y deben reflejar las condiciones de la valoración antimicrobiana.		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
Las condiciones específicas del análisis, los diluyentes utilizados, agua, condiciones de luz y temperatura deben ser reproducidas en el estudio de validación. También deben estandarizarse y cumplirse todas las condiciones de análisis en el estudio de validación exactamente como se realizaron en el análisis.		
Las condiciones de recuperación microbiana están dentro de las más críticas para calcular con exactitud el número de microorganismos presentes en una solución de prueba. La primera consideración es el medio de recuperación utilizado para permitir el crecimiento de sobrevivientes. La segunda consideración se refiere a las condiciones de incubación. Las condiciones óptimas de crecimiento deben estar presentes para asegurar el crecimiento completo y resultados reproducibles.		
MÉTODOS PARA NEUTRALIZAR LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS		
Se utilizan tres métodos para neutralizar las propiedades antimicrobianas de un producto: 1) neutralización química, 2) dilución y 3) filtración por membrana.		
NEUTRALIZACIÓN QUÍMICA		
La <i>Tabla 1</i> muestra los neutralizantes conocidos para diversos agentes antimicrobianos químicos y la toxicidad informada de algunos neutralizantes químicos para microorganismos específicos. Sin embargo, a pesar de su potencial toxicidad, la conveniencia y acción rápida de los inhibidores		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
químicos fomenta su utilización. La neutralización química de agentes antimicrobianos es el método preferido para la prueba de eficacia antimicrobiana.		
El potencial de utilidad de los neutralizantes químicos se debe considerar en las pruebas de esterilidad por filtración por membrana y de inoculación directa. Los antibióticos pueden no ser susceptibles a la neutralización por medios químicos, siendo en estos casos útil el tratamiento enzimático (p. ej., penicilinas). Estas enzimas pueden utilizarse cuando se requieran.		

Tabla 1. Algunos neutralizantes comunes para agentes antimicrobianos químicos

Neutralizante	Clase de Antimicrobiano	Acción Potencial de Agentes Antimicrobianos
Bisulfato	Glutaraldehído, mercuriales	Bacterias no esporuladas
Dilución	Fenólicos, alcohol, aldehídos, sorbato	---
Glicina	Aldehídos	Microorganismos en crecimiento
Lecitina	Compuestos cuaternarios de amonio, parabenos, bisbiguanidas	Bacterias
Iones Mg^{+2} o Ca^{+2}	EDTA	---
Polisorbato	Compuestos cuaternarios de amonio, yodo, parabenos	---
Tioglicolato	Mercuriales	Estafilococos y esporas
Tiosulfato	Mercuriales, halógenos, aldehídos	Estafilococos

Dice	Debe decir	Justificación*
Dilución		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
Un segundo enfoque para neutralizar las propiedades antimicrobianas de un producto es a través de la dilución, debido a que la concentración de un agente antimicrobiano químico ejerce un gran efecto sobre su potencia. La relación entre la concentración y el efecto antimicrobiano difiere entre los agentes bactericidas, pero es constante para cada agente antimicrobiano. Esta relación es de naturaleza exponencial, con la fórmula general:		
$C^{\eta}t = k$		
Donde:		
C = Concentración del agente antimicrobiano.		
η = Exponente de concentración (coeficiente de dilución), la pendiente de la gráfica del logaritmo de t en función del logaritmo de C.		
t = Tiempo requerido para matar un inóculo estándar.		
k = Una constante		
Los agentes antimicrobianos con valores de η altos se neutralizan rápidamente por dilución, mientras que aquellos con valores de η bajos no son buenos candidatos para la neutralización por dilución (véase Tabla 2).		

Tabla 2. Exponentes de concentración para algunos agentes antimicrobianos comunes

Agente Antimicrobiano Representativo	Valores η	Factor de Tiempo Mayor (x) para Matar Microorganismos Cuando se Reduce la Concentración a:	
		La Mitad	Un Tercio
Fenólicos	6	64	729
Alcohol	10	1 024	59 000
Parabenos	2.5	6	16



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Clorhexidina	2	4	8
Compuestos de mercurio	1	2	3
Compuesto cuaternario de amonio	1	2	3
Formaldehído	1	2	3

Dice	Debe decir	Justificación*
FILTRACIÓN POR MEMBRANA		
La neutralización mediante filtración por membrana se utiliza especialmente en pruebas de esterilidad, se basa en la retención física del microorganismo en la membrana filtrante, mientras que el agente antimicrobiano pasa a través del filtro. Luego se incubaba la membrana para la recuperación de los microorganismos viables. Sin embargo, la filtración sola puede no quitar cantidades suficientes del agente antimicrobiano como para permitir el crecimiento de los microorganismos sobrevivientes. La adherencia de los agentes antimicrobianos residuales a la membrana puede inhibir el crecimiento. La filtración a través de materiales filtrantes de poca capacidad de unión, tales como el difluoruro de poli vinilideno, ayuda a minimizar esta inhibición de crecimiento. Además, el conservador puede diluirse o eliminarse del filtro por enjuague con un líquido no tóxico, como la <i>Solución de peptona al 0.1 %</i> (véase MGA 0381. Esterilidad). Los neutralizantes químicos en el líquido de enjuague pueden asegurar que los residuos de antimicrobianos en la membrana no interfieran con la recuperación de microorganismos viables.		
VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE NEUTRALIZACIÓN		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
La validación del método para neutralizar las propiedades antimicrobianas de un producto debe cumplir con dos criterios: la eficacia y la ausencia de toxicidad del neutralizante. El método de neutralización empleado debe ser eficaz para inhibir las propiedades antimicrobianas del producto (eficacia del neutralizante) sin afectar la recuperación de microorganismos viables (ausencia de toxicidad del neutralizante). Los métodos de neutralización validados deben cumplir con estos dos criterios mediante la comparación de los resultados de la recuperación de los grupos de prueba (véase <i>Tabla 3</i>).		
El primer grupo de prueba, se adiciona el producto a la solución amortiguadora usada de acuerdo con el método de análisis con neutralizante adecuado y se inocula con un nivel bajo de microorganismos de prueba (< 100 UFC). El segundo grupo, se inocula la solución amortiguadora con menos de 100 UFC del microorganismo de prueba. El tercero grupo se inocula el producto sin exposición al esquema de neutralización. Una recuperación similar entre el primer y segundo grupo de prueba demuestra la eficacia adecuada del neutralizante y ausencia de toxicidad del neutralizante.		
En principio, el protocolo debe mostrar que la recuperación de un inóculo bajo (< 100 UFC) no es inhibida por la muestra de prueba ni por el método de neutralización. Los protocolos de validación pueden cumplir con estos dos criterios mediante la comparación de la recuperación entre tres grupos		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
de prueba distintos: 1) Producto neutralizado con inóculo, 2) Control de inóculo de prueba en solución amortiguada y 3) Inóculo en producto y ausencia del neutralizante. Esto puede establecerse comparando directamente los resultados de los grupos. (véase <i>Tabla 3</i>).		

Tabla 3. Comparación de los resultados de los tres grupos.

Grupo de Prueba	Resultado	Conclusión
1. Producto neutralizado con inóculo	Crecimiento microbiano igual a la solución diluyente	Neutralizante eficaz y no tóxico
	Ausencia de crecimiento microbiano	Neutralizante tóxico
2. Control de inóculo de prueba en solución amortiguadora	Presencia de crecimiento microbiano	Inóculo adecuado
	Ausencia de crecimiento microbiano	Verificar inóculo
3. Inóculo en producto y ausencia del neutralizante	Crecimiento microbiano igual a la solución diluyente	Funcionamiento inadecuado del antimicrobiano
	Ausencia de Crecimiento microbiano	Funcionamiento adecuado del antimicrobiano

Dice	Debe decir	Justificación*
VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE RECUPERACIÓN		
Recuperación en medio de agar		
En las pruebas de MGA 0305. <i>Efectividad de preservativos antimicrobianos</i> y MGA 0571. <i>Límites microbianos</i> el número de microorganismos de prueba en el producto se estima calculando la		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
concentración de UFC por mililitro con el método de cuenta en placa. El diseño para validar la Recuperación debe realizarse al menos tres determinaciones repetidas independientes del análisis y cada uno debe demostrar un recuento medio de cualquier microorganismo de prueba que no difiera en un factor mayor de 2, es decir, recuperación de 50 a 200 %, del valor de control en la ausencia del producto. En caso de que sea necesario solubilizar la muestra de prueba, deben determinarse los efectos del método de solubilización sobre los microorganismos viables. Esta situación puede presentarse al evaluar ungüentos, suspensiones u otros productos.		
En caso de que se requiera un mayor número de determinaciones repetidas en el estudio de validación, las comparaciones pueden evaluarse transformando los números de UFC en sus valores logarítmicos y analizando los datos estadísticamente con la Prueba t de Student (comparaciones pareadas) o con el Análisis de varianza (ANOVA) (comparando todos los grupos). Si se usa ANOVA y se determinan diferencias significativas entre las poblaciones, puede utilizarse una prueba como la de Dunnett, usando el grupo de peptona como grupo de control.		
Recuperación mediante filtración por membrana		
Esta validación sigue el procedimiento descrito en el MGA 0381. Esterilidad y en el MGA 0571. Límites microbianos, con la excepción del sembrado en medio sólido para cuantificar la recuperación. Se		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
debe recalcar que no se requiere la recuperación cuantitativa para demostrar la aptitud de la prueba de esterilidad. Solo se requiere una evaluación cualitativa (turbidez visual). Se asumen tres enjuagues de 100 mL, pero el volumen y el número de enjuagues están sujetos a validación. Se debe usar un máximo de cinco lavados de 100 mL para el análisis de rutina, incluso si durante la prueba de aptitud del método se ha demostrado que tal ciclo no elimina por completo la actividad antimicrobiana. Cada prueba de validación debe realizarse en forma independiente al menos tres veces. Si no se logra neutralizar la actividad antimicrobiana de la muestra, se puede asumir que el producto no es susceptible de contaminarse con las especies de microorganismos probadas.		
En el grupo de solución de prueba, se pasa el producto a través de la membrana filtrante, seguido de dos porciones de 100 mL de líquido diluyente y neutralizante. Después de filtrar el segundo enjuague, pasar por el filtro una porción final de 100 mL que contenga un número ≤ 100 UFC del microorganismo de prueba específico. Colocar esta membrana en el medio de recuperación de agar apropiado e incubar.		
Sembrar el inóculo directamente sobre el medio sólido. Es posible que la filtración en sí reduzca la recuperación del microorganismo de prueba, ya sea por la toxicidad inherente de la membrana o por adherencia del microorganismo a las paredes de la unidad de filtración. Puede utilizarse un grupo de control para evaluar este componente de		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
validación de filtrado por membrana. Usar el líquido de enjuague como medio de dilución sin exponer el filtro al producto. Después de agregar el inóculo de nivel bajo al enjuague final, sembrar el filtro según se indica más arriba. La pérdida de microorganismos específica de la técnica puede calcularse comparando la recuperación en el grupo de la solución de enjuague (véase MGA 0381. Esterilidad y MGA 0571. Límites microbianos), con el recuento del inóculo.		
En este análisis se supone que la muestra de prueba puede filtrarse. En caso de que sea necesario solubilizar la muestra de prueba, deben determinarse los efectos del método de solubilización sobre los microorganismos viables. Esta situación puede presentarse al evaluar ungüentos, suspensiones u otros productos.		
El método puede considerarse validado si la tasa de recuperación en las tres determinaciones repetidas independientes es similar para la solución de prueba y el control de la solución amortiguadora.		
Recuperación en medio líquido		
En el MGA 0381. Esterilidad, Método directo y MGA 0571. Límites microbianos se supone que el medio de recuperación permitirá el crecimiento de todos los microorganismos sobrevivientes. El caldo en la prueba debe servir tanto para neutralizar cualquier propiedad antimicrobiana de la solución de prueba como para ayudar al crecimiento de los microorganismos considerando los grupos de tratamiento descritos en Validación de Métodos de		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
<i>Neutralización.</i> Las comparaciones de recuperación se pueden utilizar para la validación del método de recuperación, variando las proporciones entre el producto y el medio de recuperación para alcanzar la neutralización adecuada. El método se puede considerar validado si todos los grupos muestran crecimiento claramente visible, al ser comparado visualmente con el recipiente control sin producto dentro del periodo de tiempo indicado en el MGA 0381 y MGA 0571.		
RECUPERACIÓN DE MICROORGANISMOS DAÑADOS		
Los estudios de validación descritos anteriormente utilizan microorganismos de prueba que nunca han sido expuestos a agentes antimicrobianos y que por lo tanto no son idénticos a los organismos observados en las pruebas de efectividad antimicrobiana o cuando se lleva a cabo una prueba de esterilidad en un producto conservado. Si se desea utilizar medios alternativos, debe tratarse la recuperación de microorganismos dañados en el estudio de validación. Esto puede realizarse comparando directamente la recuperación de cada microorganismo de prueba en el medio indicado en el método y en el medio alternativo, luego de la exposición al producto. Esta exposición debe incluir al menos dos periodos de tiempo que muestren la supervivencia de no más de 100 UFC/mL, a menos que la velocidad de muerte del agente antimicrobiano sea tal que no sea posible ninguna		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
recuperación, aunque los microorganismos se siembren algunos minutos después de haber estado expuesto. Esta comparación debe realizarse al menos tres veces con muestras diferentes. El medio alternativo queda validado si la recuperación observada en ese medio no es menor que la observada en el medio indicado, dentro de un error de 0.5 unidades logarítmicas.		
CÁLCULO DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS		
La exactitud de cualquier cálculo de UFC está afectada por el número de microorganismos inoculados. A medida que aumenta el número de microorganismos inoculados, los efectos de la aglomeración reducen la exactitud del recuento, disminuyendo así el valor estimado. A medida que el número disminuye, el error aleatorio juega un rol cada vez más importante en el cálculo. El intervalo aceptado para el recuento de colonias en una placa de agar estándar está entre 25 y 250 para la mayoría de las bacterias y para <i>Candida albicans</i> . Este intervalo se estableció en la industria alimenticia para contar los bacilos coliformes en la leche. Este intervalo es aceptable para microorganismos farmacopeicos, excepto para los hongos filamentosos. No es óptimo para contar todas las cepas aisladas del medio ambiente. El intervalo de recuento recomendado para <i>Aspergillus brasiliensis</i> es entre 8 y 80 UFC/placa.		
Deben justificarse los umbrales de recuento más bajos para las diluciones mayores sembradas en		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice			Debe decir	Justificación*
serie. El número de colonias en una placa sigue la distribución de Poisson, de modo que la varianza del valor medio es igual al valor medio de los recuentos. Por lo tanto, a medida que disminuye el número promedio de UFC por placa, aumenta el error porcentual del cálculo (véase <i>Tabla 4</i>). Por ejemplo, si se encuentran 3 UFC/placa en la dilución 10^{-1} , se calculan 30 UFC/mL, con un error de cálculo del 58 %.				
<i>Tabla 4.</i> Error como porcentaje de la media para recuentos en placas.				
UFC / Placa	Error Estándar	Error como % de la media		
30	5.48	18.3		
29	5.39	18.6		
28	5.29	18.9		
27	5.20	19.2		
26	5.10	19.6		
25	5.00	20.0		
24	4.90	20.4		
23	4.80	20.9		
22	4.69	21.3		
21	4.58	21.8		
20	4.47	22.4		
19	4.36	22.9		
18	4.24	23.6		
17	4.12	24.3		
16	4.00	25.0		
15	3.87	25.8		
14	3.74	26.7		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice			Debe decir	Justificación*
13	3.61	27.7	CONSULTA	
12	3.46	28.9		
11	3.32	30.2		
10	3.16	31.6		
9	3.00	33.3		
8	2.83	35.4		
UFC / Placa	Error Estándar	Error como % de la media		
7	2.65	37.8		
6	2.45	40.8		
5	2.24	44.7		
4	2.00	50.0		
3	1.73	57.7		
2	1.41	70.7		
1	1.00	100.0		
Validación de Diluyentes y Medios de transporte				
Se debe determinar la capacidad del diluyente y medio de transporte para la supervivencia de los microorganismos sin multiplicación o reducción de estos durante el período de contacto antes de la inoculación en placa o medios líquidos.				
Diluyente				
En tubos con 9 mL del diluyente se inoculan con 1 mL de la suspensión de microorganismos de prueba que contiene alrededor de 10^3 UFC/mL, para tener una concentración final de 100 UFC/mL, de este diluyente inocular 1 mL en la caja Petri y adicionar agar no selectivo (medio de referencia) como agar de soya tripticaseína (t_0).				



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
Mantenga el diluyente inoculado a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo especificado entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo (generalmente 45 min). Después tomar 1 mL en la caja Petri y adicionar agar de soya tripticaseína (t_1).		
Incubar a la temperatura correspondiente a los microorganismos inoculados durante 72 h, contar el número de microorganismos presentes en las placas.		
El número de microorganismos presentes en las placas de diluyente que estuvo a temperatura ambiente (t_1), debe estar dentro de $\pm 30\%$ del valor inicial (t_0).		
Medio de transporte		
En tubos con 9 mL del medio de transporte se inoculan con 1 mL de la suspensión de microorganismos de prueba que contiene alrededor de 10^3 UFC/mL, para tener una concentración final de 100 UFC/mL, de este diluyente inocular 1 mL, en la caja Petri y adicionar agar no selectivo (medio de referencia) como agar de soya tripticaseína (t_0).		
Mantener el medio de transporte inoculado a temperatura ambiente y de refrigeración durante un periodo de tiempo especificado. Después de este tiempo tomar 1 mL en la caja Petri y adicionar agar de soya tripticaseína (t_1).		
Para la inoculación de medios de transporte con dispositivos de muestreo, colocar de muestreo		



“2025, Año de la Mujer Indígena”

Dice	Debe decir	Justificación*
(hisopos) en un volumen apropiado, después inocular el medio de transporte con el dispositivo e inmediatamente tomar 1 mL de medio de transporte en la caja Petri y adicional agar de soya tripticaseína (t_0).		
Mantener el medio de transporte con el dispositivo inoculado a temperatura ambiente y de refrigeración durante un periodo de tiempo especificado. Después de este tiempo tomar 1 mL en la caja Petri y adicionar agar de soya tripticaseína (t_1).		
Incubar a la temperatura correspondiente a los microorganismos inoculados durante 72 h, contar el número de microorganismos presentes en las placas.		
El número de microorganismos presentes en las placas de diluyente que estuvo a temperatura ambiente (t_1), debe estar dentro de $\pm 30\%$ del valor inicial (t_0).		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.