



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CARRERA DE FARMACIA



Efectividad del método Cilindro-Placa, esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de prueba. Managua 2009.

Monografía para optar al título de Licenciado Químico-Farmacéutico

Integrantes:

- ❖ Br. Luís Alberto Lindo Rojas.
- ❖ Br. Francisco Javier López Cáseres.
- ❖ Br. Carlos Eduardo López Villegas.

Tutoras: Msc. Lissett Arauz Molina.

Lic. Patricia Baca.

Asesora: Lic. Mirna Mendoza.



AGRADECIMIENTO

Le damos gracias a Dios, por permitir mantenernos con salud y fe todo el periodo de estudio, por iluminar nuestras mentes, ya que sin su luz seria imposible haber hecho esta monografía.

A nuestros padres por apoyarnos en cada momento que necesitáramos de su ayuda económica o moral, la que fue incondicional en nuestras vidas, por estar con nosotros siempre y por demostrarnos su amor desinteresado.

A nuestros familiares y amigos que de una u otra manera se hicieron presentes para darnos una mano cuando la necesitáramos, por darnos siempre la aprobación y el respeto que merecemos y por preocuparse siempre por nuestro bienestar.

A Msc. Lissett Arauz Molina por su abnegada labor de guiarnos durante nuestro trabajo monográfico e impulsarnos para que este se llevara a cabo de manera exitosa. A ella gracias por el tiempo dedicado.

A Lic. Nubia Blanco Sampson por darnos la oportunidad de realizar nuestro tema de investigación en el Laboratorio que dirige.

Al personal del LNCCM por habernos recibido y darnos su apoyo en el transcurso de este trabajo monográfico, Lic. Mirna Mendoza Pérez, Lic. Patricia Baca Solís, Lic. Santiago Mejía Sánchez y el personal de apoyo Sra. Francisca Alegría Castellón Ana, Sr. Alberto Vásquez Cruz.



Dedicatoria

Le dedico a Dios esta monografía ya que el ha sido uno de mis mayores motivos de felicidad a lo largo de este tiempo, siempre ha sido el que me a acompañado cuando he necesitado fuerzas para seguir adelante, me sostuvo cuando necesite un apoyo y siempre hizo salir el sol sobre mi cabeza, dándome el despertar de cada día para demostrar que nunca se olvidó de mí.

A mis padres les dedico mi monografía para demostrarles que siempre valore sus esfuerzos, dedicación y trabajo que sin cesar lo hacían, le dedico todo el trabajo que he hecho de manera especial ya que quisiera de cualquier forma honrar su empeño que desde pequeño pusieron en mí.

A mis hermanos que aprecio con mucho amor, ya que ellos han sido motivo de superación, “llegar a la meta siempre y lo mas rápido que se pueda y lo mejor que se pueda” es el lema que llevamos dentro porque somos personas que anhelamos mucho llegar a ser alguien en la vida, así que de cierta manera este trabajo se los dedico para que sepan que un día yo también llegue a la meta.

A Miriam López por compartir grandes momentos en la universidad, brindarme amor, comprensión y apoyarme siempre en lo que necesité.

Luis Lindo



DECICATORIA

Dedico esta investigación monográfica a mi Padre salvador y su hijo Jesucristo porque me dieron fuerzas, esperanzas, voluntad y fe para ser una persona profesional en la cual me he transformado, han estado cada segundo de vida, dándome el aliento para sobrevivir a los momentos duros y abatidos que he tenido.

A mi padre, madre, hermano y familiares, por nunca dejarme solo, sintiéndome una persona siempre amada, aunque siempre lejos de ellos me dieron palabras de motivación para salir adelante.

A Celina mercedes Escobar Amaya, más que abrirme sus brazos de amistad me regaló su amor dándome más fuerza y motivos para superarme “gracias”.

A mis amigos, compañeros, maestros y todas aquellas personas que he conocido durante mi estadía en esta alma Mater, personas que me han permitido crecer a nivel moral como profesional pues considero que de este tipo relaciones y transferencia de experiencia hacen de un profesional una persona exitosa y con gran deseo de superación.

Francisco López Cáseres



DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la oportunidad de nacer y guiar mi vida por el camino del bien; por ser la luz que ilumina mi vida. Dame salud y fortaleza para salir adelante y levantarme siempre después de una caída.

A mi Madre María Elena Villegas; quien se ha sacrificado por sacarme adelante y hacer de mí una persona buena, por sus buenos consejos. Por ser comprensiva y paciente en los momentos que más he necesitado de ella. A ella por ser muy importante y un ejemplo en mi vida a quien le demostré que su esfuerzo no ha sido en vano, para ella mi respeto y admiración.

A mi familia por apoyarme y darme fuerzas para seguir adelante, por ser un ejemplo para mí y guiarme por el buen camino.

A mi novia Heleni Francis Delgado; por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos dándome su apoyo, su amor y comprensión. Por estar junto a mí cuando la necesitaba y por guiarme ha ser una mejor persona.

Carlos López.

INDICE



1. Introducción.....	01
2. Tema y Objetivos	04
3. Marco Teórico.....	05
4.1. Pruebas y valoraciones biológicas.....	06
4.2. Tinción de Gram.....	18
4.3. Diseño experimental.....	19
4.4. Medidas de Dispersión.....	27
4.5. Material de Laboratorio.....	29
4.6. Métodos de Esterilización.....	32
4.7. Propiedades Físico-Químicas.....	34
5. Diseño Metodológico:	35
5.1. Tipo de Estudio.....	36
5.2. Operacionalización de las variables.....	36
5.3. Procedimiento.....	37
5.4. Ejecución del ensayo.....	38
5.5. Material y Equipos.....	51
6. Resultados.....	54
7. Análisis de los Resultados	79
8. Conclusiones.....	82
9. Recomendaciones.....	84
10. Bibliografía.....	86
11. Anexos.....	88



1. INTRODUCCION

En la actualidad, son numerosos los laboratorios comerciales que preparan antibióticos; estableciéndose una competencia en su producción, formas de presentación, así como también las aplicaciones clínicas, las diferentes dosis, grados variables de actividad y por supuesto



potencia en donde han requerido el establecimiento de un organismo estatal regulador y de control para este tipo de medicamentos.

El ensayo de potencia de antibiótico en un análisis es una de las herramientas microbiológicas más utilizada para establecer si el antibiótico logra cumplir con las especificaciones de los estándares requeridos en donde el método Cilindro-Placa se utiliza para verificar la actividad microbiológica de nuestro antibiótico. En países latinoamericanos como Colombia, Paraguay, Brasil, Bolivia se realiza el ensayo de potencia de antibiótico esterilizando solamente el material que entra en contacto con el microorganismo. Los Laboratorios Nacionales tradicionalmente han venido utilizando el ensayo de Potencia de antibiótico con material volumétrico estéril que entra en contacto con el microorganismo. En nuestra revisión bibliográfica no encontramos investigaciones relacionadas a nuestro perfil de estudio, pero si se encontraron otros estudios:

Sáenz Bolaiñez Irela y Samcan Corea Suyen. Validación del método microbiológico de sulfato de gentamicina en inyectable, elaborado en los laboratorios Solka, S.A. UNAN-león, 1998.

Rojas Mayorga Cecilia Cristina, Torres Reyes Rubenia Mercedes, Toruño Gutiérrez. Determinación de la potencia antibiótica en 4 especies vegetales, *Crysophila*, *Cojota caturatos*, *Cryclanthus bipartitus*, *Talisia nervosa* por el método de difusión agar. Tesis Licenciatura en Farmacia y Química. Tutor Kelvin José Núñez Martínez. León, Nicaragua, UNAN, 2003.

En la USP XXX no se encontró referencias sobre la esterilización del material volumétrica en el análisis de potencia de antibióticos, solo refiere la esterilización del material que entra en contacto con el microorganismo. En el presente estudio se quiere demostrar que se puede



realizar el ensayo con material volumétrico no estéril, que contribuiría a reducir el tiempo del análisis al no requerir de tiempo de esterilización seca, la cristalería no estaría sometida a temperaturas altas (180°C) constantemente contribuyendo a la disminución de su vida media.

Debido a que las determinaciones microbianas de potencia están sometidas a variables intra e inter ensayos, se requieren dos o más ensayos independientes para una estimación fiable de la potencia en donde para obtener una precisión mínima requerida para la valoración aceptable de un antibiótico va a depender de los límites de aceptación, una especialidad acabada con intervalos de aceptación del 95-105% o 90-110% requiere un número de réplicas bajo $n= 2-3$, si los límites de aceptación son más estrechos 98-102% el número de réplicas debe ser mucho mayor $n \geq 6$ motivo por el cual los ensayos se deben efectuar en días diferentes para obtener resultados idóneos ya que los sistemas biológicos presentan una variabilidad que obliga a tener diferentes criterios para verificar y realizar ensayos.

La variación de este método será de gran aporte para el laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos MINSA y demás laboratorios privados que realicen este método ya que contribuirá a disminuir el tiempo de este tipo de análisis y mejorar el método disminuyendo el margen de error en la medida de los volúmenes, además de reducir el costo económico de este tipo de ensayo.

2. Tema:



Efectividad del método Cilindro-Placa, esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de prueba. Managua 2009.

3. Objetivos:

General:

Comprobar la efectividad del método Cilindro-Placa, esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de prueba.

Específicos:

1. Efectuar el análisis de potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de prueba.
2. Realizar la caracterización de la cepa control de *St. epidermidis*.
3. Verificar la ausencia de microorganismos contaminante en el agar utilizado para el ensayo microbiológico de gentamicina, mediante aislamiento en agar sangre de carnero y agar manitol.
4. Cumplir con los criterios de aceptación del diseño experimental.
5. Comparar los resultados obtenidos aplicando el método en el que se esteriliza todo el material volumétrico y el método esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo.
6. Ejecutar la Calibración del balón aforado de 25ml en condición esterilizada y no esterilizada.



4. MARCO TEORICO

4.1. Pruebas y valoraciones biológicas.

4.1.1 Valoraciones Microbiológicas-Antibióticos.



4.1.1.1 Aparato

Todos los equipos deben limpiarse bien antes y después de cada uso. Los elementos de vidrio utilizados para conservar y transferir los organismos de prueba se esterilizan con calor seco o vapor.

4.1.1.2 Control de Temperatura.

Se requiere control termostático en varias etapas de una valoración microbiológica: durante el cultivo de un microorganismo y la preparación del inóculo, así como durante la incubación en placa y las valoraciones en tubo. Mantener la temperatura de las placas de valoración a $\pm 0.5^\circ$ de la temperatura seleccionada. Es imperativo un control más estricto de la temperatura ($\pm 0.1^\circ$ de la temperatura seleccionada) durante la incubación en una valoración en tubo y puede lograrse con circulación de aire o agua. La mayor capacidad térmica del agua representa una ventaja respecto del aire en circulación.

4.1.1.3 Espectrofotometría.

La medición de la transmitancia dentro de una banda de frecuencia relativamente estrecha requiere un espectrofotómetro adecuado en el que pueda variarse o restringirse la longitud de onda de la fuente luminosa mediante el uso de un filtro de 580nm o 530nm para leer la absorbancia en una valoración en tubo. Para este último propósito, el instrumento puede disponerse de manera tal que acepte el tubo en el que tiene lugar la incubación, que acepte una celda modificada equipada con un drenaje que facilita el cambio rápido del contenido o preferentemente, que tenga una celda de flujo directo para un análisis de flujo continuo; regular el instrumento a una absorbancia igual a cero con caldo no inoculado transparente preparado según las especificaciones de cada antibiótico, incluyendo la misma cantidad de solución de prueba y formaldehído que se encuentra en cada muestra.

NOTA: puede utilizarse la medición de la absorbancia o transmitancia para preparar los inóculos.

4.1.1.4 Receptáculos de valoración en Cilindro-Placa



Para las placas de valoración, utilizar placas de Petri de vidrio o plástico (aproximadamente 20x 100mm) con cubiertas de un material adecuado. Para los cilindros de valoración, utilizar cilindros de acero inoxidable o porcelana con las siguientes dimensiones, cada una de las cuales tiene una tolerancia de ± 0.1 mm: diámetro externo 8mm; diámetro interno 6mm y longitud 10mm: limpiar con cuidado los cilindros para eliminar todos los residuos. Ocasionalmente, se requiere una limpieza con un baño ácido ejemplo: con ácido nítrico 2N o con ácido crómico.

4.1.1.5 Medios y Diluyentes

4.1.1.5.1 Medios de cultivos

Antes de afrontar una validación de un método microbiológico se debe tener la seguridad de que los medios de cultivo que se van a utilizar tienen una calidad adecuada. Esta calidad viene definida por sus propiedades nutritivas y selectivas. En consecuencia se debe establecer un programa de control de los medios de cultivo. Los medios requeridos para la preparación de los inóculos de organismo de prueba están hechos con los ingredientes mencionados en este texto. Podrán utilizarse ligeras modificaciones de los ingredientes individuales, o medios deshidratados reconstituidos, siempre y cuando los medios resultantes posean las mismas propiedades de promoción de crecimientos o superiores y produzcan una curva de respuesta estándar similar.

Disolver los ingredientes en agua para hacer 1L y ajustar las soluciones de hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N, según sean necesarios para obtener el pH especificado después de la esterilización con vapor.

Se puede obtener de medios de cultivos de 2 semanas:

Preparados por un laboratorio externo fabricante de medios de cultivo se exigirá un certificado de análisis de cada lote de medio donde constan los resultados obtenidos en los ensayos de esterilidad y de las propiedades nutritivas y selectivas, así como una breve descripción del



método de control y la fecha de caducidad. Es aconsejable que los controles se realicen como mínimo con las cepas de microorganismos que se especifican en la Farmacopea. Además es recomendable efectuar controles periódicos en el momento de la recepción en el laboratorio para comprobar la calidad de los medios.

Se realizará controles visuales; controles de esterilidad y controles de crecimiento/ inhibición similares a los que se describen por los medios preparados a partir de medios deshidratados.

Preparados en los laboratorios a partir de medios deshidratados. Los medios se preparan según las indicaciones del fabricante utilizando agua purificada. En este caso se exigirá el certificado analítico de cada lote de medio deshidratado. Además, el laboratorio deberá efectuar ensayos que demuestren la esterilidad y las propiedades nutritivas y selectivas de los medios de cultivos preparados a partir de medios deshidratados.

Para los medios de cultivo generales se utilizarán las cepas que se indican en la Farmacopea, para los medios selectivos se utilizarán microorganismos que presenten buen crecimiento y otros cuyo crecimiento este inhibido en este medio. Los ensayos se deberán hacer para cada lote de medio que se prepare.

Es aconsejable también asignar a los medios preparados en los laboratorios una fecha de caducidad. Esta fecha dependerá del medio que se trate y de las condiciones de conservación.

4.1.1.5.2 Diluyentes

La función de un diluyente es dispersar o diluir el producto a examinar. Las farmacopeas oficiales recomiendan varios diluyentes, los cuales están ya validados en el sentido de que no interfieren en la viabilidad de microorganismo.

4.1.1.6 Soluciones amortiguadoras de fosfato y otras soluciones.

Preparar las soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio requeridas para el antibiótico en análisis de la siguiente manera, o por otros medios adecuados. Las soluciones amortiguadoras



se esterilizan después de su preparación y el pH especificado en cada caso corresponde al pH después de la esterilización.

4.1.1.7 Unidades y Estándares de referencia.

La potencia de los antibióticos esta especificada en “Unidades” o “ug” de actividad. En cada caso la “Unidad” o “ug” de actividad del antibiótico se establecen y se definen según el estándar maestro federal designado para dicho antibiótico. El Estándar de Referencia USP correspondiente se calibra según el estándar maestro.

El concepto de “ug” de actividad se origino en un caso en que se considero que a preparación antibiótica seleccionada como estándar de referencia consistía totalmente en una sola entidad química y, por lo tanto, se le asigno una potencia de 1000 “ug” por mg. En varios casos de este tipo, como resultado de desarrollo de métodos de fabricación y purificación para antibióticos particulares, se obtuvieron preparaciones que contenían más de 1000 “ug” de actividad por mg. Luego se comprendió que dicha preparaciones tenían una actividad equivalente a un número de “ug” determinados del estándar de referencia original. En la mayoría de los casos, no obstante, los “ug” de actividad equivalen exactamente a los ug (peso) de la sustancia pura.

En algunos casos surgen complicaciones, por ejemplo, cuando un antibiótico existe como base libre y en forma salina y los “ug” de actividad se han definido en términos de una sola de dichas formas; cuando la sustancia antibiótica consta de un numero de componentes muy similares químicamente pero con diferente actividad antibiótica o cuando las potencias de una familia de antibióticos se expresan en términos de un estándar de referencia, que consta de un solo miembro que, no obstante, podría ser heterogéneo. En dichos casos, los “μg” de actividad definidos en términos de un “Estándar Maestro” equivalen a una “Unidad”. Por consiguiente no debería suponerse que los “μg” de actividad corresponden a los μg (peso) de la sustancia antibiótico.

4.1.1.8 Preparación del estándar.



Para preparar una solución madre, disolver una cantidad de estándar de referencia USP e un determinado antibiótico, pesado con exactitud o todo el contenido del vial e estándar de referencia USP, cuando corresponda, el disolvente especificado se usa con la tabla no. Y diluir hasta la concentración requerida según lo indica. Conservar en un refrigerador y usar en le periodo especificado. El día de la valoración preparar a partir e la solución madre 5 o más diluciones, por lo general, con una diferencia de concentración entre diluciones sucesivas en una proporción de 1:1.25 para el caso de una valoración en cilindro en placa.

4.1.1.9 Preparación de la muestra.

A partir de la información disponible para la preparación que se va a valorar (la muestra desconocida) asignarle a esta una potencia supuesta por unidad de peso volumen y sobre esta suposición preparar una dilución de prueba según se especifica para cada antibiótico pero con el mismo diluyente final utilizado para el estándar de referencia USP. La valoración con 5 niveles de estándar requiere un solo nivel de la muestra desconocida a una concentración que se supone igual al nivel medio de estándar.

TABLA No.1. Soluciones de trabajo del estándar de referencia.



Solución stock estándar de trabajo	Antibiótico	Gentamicina
	Condición de secado	3 horas
	Solvente inicial	Buffer #3
	Diluyente	3
	Concentración final U o mg/ml	1mg
	Almacenamiento bajo refrigeración	1mes
Concentración del estándar	Solvente final	Buffer #3
	Concentraciones finales U o μg de antibiótico/ml	0.064, 0.080, 0.100, 0.125, 0.156 μg

Tabla basada en la USP 30/NF 25, versión en español.



TABLA No.2. Preparación de las solución madre y diluciones de prueba de estándares.

Antibiótico y tipo de valoración (cilindro-placa) CP.	Soluciones madre		dilución de prueba		
	Disolvente inicial (concentraciones en aquellos en que este especificado)diluyente posterior si es diferente	Solución madre final concentración por ml.	Usar dentro	Diluyente final	Dosis media(mcg de actividad o unidades por ml
Gentamicina (CP)	B3	1 mg	30 días	B3	0.1mcg

Tabla basada en la USP 30/NF 25, versión en español.

4.1.2 Organismo e inóculo.

4.1.2.1 Organismo de Prueba

El organismo de prueba para cada antibiótico se indica en la tabla no.3 junto con el numero de identificación ATCC american type culture collection (colección de cultivos tipo de EEUU). Indicando también el método de valoración para cada uno de los antibióticos. Mantener un cultivo sobre medio inclinado y bajo las condiciones de incubación especificados en la tabla no.4 transferir semanalmente a un tubo con medio inclinado.



TABLA No.3. Organismo de prueba para cada antibiótico valorado según el procedimiento indicado.

Antibiótico	Organismo de prueba	Numero ATCC.
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermides</i>	12228

Tabla basada de USP 30/NF25, versión en español.

4.1.2.2 Preparación del inóculo.

Antes de realizar una valoración, retirar el cultivo de una pendiente o cultivo reciente de organismo, con 3 ml de solución salina estéril SR y perlas de virio estéril. Inocular la superficie de 250 ml del medio agar especificado para cada antibiótico.

Expandir la suspensión en forma pareja sobre la superficie del agar con ayuda de perlas estériles e incubar a la temperatura indicada durante aproximadamente el tiempo señalado. Una vez finalizado este tiempo, preparar la suspensión madre recogiendo el cultivo de la superficie en 50ml de solución salina estéril SR.

Para la valoración en Cilindro en Placa, determinar mediante ensayo las proporciones de suspensión madre que se deben incorporar en el inóculo. Comenzando con los volúmenes indicados en la tabla no.4, que den como resultado una demarcación satisfactoria de inhibición de aproximadamente 14-16 mm de diámetro y produzca una relación de dosis reproducible.

Preparar el inóculo añadiendo una porción de suspensión madre a una cantidad suficiente de medio agar y enfriado de 45-50°C y agitando por rotación moderada para lograr una suspensión homogénea.

**TABLA No.4. Preparación del inóculo.**

Organismo de prueba (ATCC)	Condiciones de inoculación			Composición del inóculo	
	Medio	Temperatura	Tiempo	Medio	Cantidad mlx100mL
S. Epidermidis (12228)	1	32-35	24 horas	11	0.25

Tabla basada de la USP 30/NF 25, versión en español.

4.1.2.3 Cepas control.

Antes de iniciar un método microbiológico es imprescindible constar con cepas de microorganismos control que constituyen el reactivo estándar biológico. Estos microorganismos normalmente serían los necesarios para la comprobación de los métodos de control de productos no estériles y estériles, los aislados frecuentemente en las zonas de fabricación o los esterilizados para valoraciones de antibióticos y ensayos de eficacia.

Las cepas de microorganismos deben tener origen e identidad conocida así como una estabilidad bioquímica que minimice la variabilidad, debido al reactivo biológico.

El crecimiento y la preparación de microorganismos determinan el estado fisiológico de las células, el cual tiene influencia directa en el resultado de los ensayos. Los ensayos microbiológicos no utilizan células individuales si no poblaciones de células. Los datos generados en estos ensayos son menos variables si las poblaciones celulares son homogéneas

Según se indica en Farmacopea Europea y en la USP, el cultivo de microorganismo que se vaya a utilizar como inóculo de un método debe de proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original. Un subcultivo se define como la siembra de microorganismos a partir de un cultivo a medio fresco estéril. En el caso de microorganismos que se conservan congelados cada ciclo de congelación, descongelación y revivificación se considera subcultivo.



4.1.2.4 Cultivos de trabajo.

A partir de un cultivo primario puede realizarse 4 subcultivos de trabajo y de estos realizarse 2 o 3 siembras, según las necesidades. Aumentar el número de resiembras incrementando el riesgo de alteración fenotípica. Se recomienda no realizar más de 5 pases desde la cepa original.

Par obtener un subcultivo de trabajo, se siembra sobre medio inclinado placa a partir del cultivo primario se incuba en las condiciones que requiera el microorganismo hasta obtener el crecimiento adecuado.

Los subcultivos pueden conservarse a temperatura ambiente durante 4 semanas, si bien es preferirlos mantenerlos en nevera a 2-8°C.

4.1.2.5 Suspensiones Normalizadas o Estandarizadas.

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona 1 metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados normalmente, la Farmacopea para ensayos de recuperación microbiológica en presencia del producto indica que se siembra un número determinado de microorganismos cultivos recientes. Es por ello, que debemos tener 1 sistema para asegurar el número aproximado de microorganismos que tenemos en una suspensión sin tener que esperar a los resultados de un recuento, ni trabajar a ciegas.

La manera más fácil de estandarizar 1 suspensión de microorganismos es por determinación de la turbidez en un espectrofotómetro o en escala de Macfarland. Siempre que preparemos la suspensión en un mismo medio y a la misma turbidez medida en un espectrofotómetro a 1 longitud de onda determinada, tendremos aproximadamente el mismo número de microorganismos.

4.1.3 Procedimiento: Diseño de la Valoración.



La Valoración Microbiológica aumenta su precisión con la segregación de fuentes relativamente de posibles errores y desviación mediante diseños experimentados.

Es una valoración Cilindro en Placa, las comparaciones esenciales están registradas a las relacionadas entre las mediciones de diámetro de la zona dentro de las placas, sin tener en cuenta la variación-placa en su preparación y posterior manipulación.

Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas a variables intervaloraciones e intravaloraciones de modo tal que se requieren 2 o mas valoraciones independiente para obtener una estimación confiable de la potencia de una determinada preparación de valoración o muestra desconocida.

Comenzando con la solución madre y diluciones de prueba del estándar y de la muestra desconocida, repetir otro día la valoración de una muestra desconocida dada.

Si la potencia estimada de la segunda valoración difiere mucho, según lo indique el error estándar calculado respecto de la primera realizar una o más valoraciones adicionales.

El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes mas pequeña a lo largo de varios días es una estimación más confiable de la potencia que el objetivo de una valoración grande con el mismo numero total placas o tubos.

4.1.3.1 Método Cilindro-Placa

Para preparar placas de valoración utilizando placas petri, colocar 21mL de medio 2 en cada una de las cantidades requeridas y dejar que se endurezca para formar 1 capa base lisa de profundidad uniformemente.

En el caso de la Gentamicina utilizar medio 11, agregar 4mL del inculo de cada siembra, inclinando la placa hacia atrás y hacia adelante para esparcir el inculo uniformemente sobre la superficie y dejar que se endurezca. Dejar caer 6 cilindros sobre la superficie inoculada desde una altura de 12 mm, utilizando una guía mecánica u otro dispositivo para asegurar el espacio uniforme en un radio de 2.8cm y cubrir las placas para evitar la contaminación.



Después de llenar los 6 cilindros sobre cada placa con diluciones de antibiótico que contengan los niveles de prueba que se especifican a continuación.

Incubar las placas a una temperatura de 36-37.5°C de Gentamicina durante 16-18 horas, retirar los cilindros, medir y registrar el diámetro de cada zona de inhibición de crecimiento con aproximadamente 1mm para valoraciones de un nivel con curvas estándar preparar disoluciones que representen 5 niveles de prueba del estándar (S_1 a S_5)

Y un nivel de prueba único de la muestra desconocida U_3 correspondiente a S_3 de la curva estándar, según se define en la preparación de estándar y preparación de la muestra.

Para derivar la curva estándar llenar los cilindros en cada 1 de las 3 placas con la dilución de prueba media (S_3) del estándar y cada uno de los nueve cilindros restantes con una de las 4 diluciones estándar. Repetir el proceso para las diluciones del estándar.

Para cada muestra desconocida, llenar los cilindros alternos en cada una de las 3 placas con la dilución de prueba media del estándar (S_3) y cada uno de los 9 cilindros restantes con la dilución de prueba correspondiente (U_3) de la muestra desconocida.

4.1.3.2 Calculo.

Para calcular la potencia a partir de datos obtenidos con el método de cilindro en placa o el método turbidimétrico, proceder en cada caso según se indica en potencia interpolada a partir de una curva estándar, Utilizando el método de regresión lineal por mínimos cuadrados y una prueba de linealidad. En aquellos casos que se realiza un número de valoraciones del mismo material con la misma curva estándar, calcular el coeficiente de variación en el resultado de todas las valoraciones de material. En aquellos caso que se realiza más de una valoración del mismo material con diferentes curvas estándar, promediar los dos o mas valores de la potencia.



4.2. Tinción de Gram.

La tinción de gram o coloración de gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram. Las tinciones diferenciales son aquellas que se usan para diferenciar de manera mas explicita los microorganismos. Estas tinciones utilizan los colorantes diferenciales, que se componen de más de una sustancia tintórea. En algunas técnicas de coloración, las tinciones diferenciales mas importante que se emplea en bacteriología son las de gram y la tinción acido resistente.

Se utiliza tanto para referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias gram positivas a las bacterias que se visualizan de color violeta y bacterias gram negativas a las que se visualizan de color rosa.

El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células de las bacterias, tanto en gram positivas como en gram negativas.

El lugol esta formado por I_2 en equilibrio con KI , el cual esta presente para solubilizar el Yodo. El Yodo entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.

La mezcla de Alcohol-cetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2 /cristal violeta. Los organismos gram positivos no se decoloran, mientras que los gram negativos si lo hacen.

Para poner de manifiesto las células gram negativas utilizan una coloración de contraste. Habitualmente es una coloración de color rojo, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen azules.



La safranina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas si se uso por ejemplo safranina.

4.3. Diseño Experimental

Cualquier dosificación proporciona un valor al que se le atribuye cierta precisión experimental ligada a la toma de muestras, las diluciones y las mediciones. Esta precisión se estima efectuando cierto número de determinaciones independientes y calculando la desviación estándar.

Se debe considerar que el reactivo es un organismo vivo cuyos crecimientos y multiplicación presentan un carácter aleatorio. Lo que se mide al final de un experimento es en cierto modo la suma de una infinidad de reacciones independientes. Para compensar este carácter aleatorio y tomarlo en cuenta, es necesario repetir el ensayo, en difusión se utilizan 10 cajas de petri.

La necesidad de verificar el paralelismo y la linealidad de las regresiones del patrón y la muestra obliga a emplear al menos 2 concentraciones.

Un plan experimental comprende entonces varias concentraciones de patrón y muestra, y varias repeticiones de cada una de ellas.

El plan experimental habitual consiste en preparar una serie de 5 concentraciones crecientes del antibiótico de referencia, una progresión geométrica de 2 o 1.5 según la concentración media, esto a fin de trazar una curva de referencia. La solución muestra en una concentración estimada cercana a la solución media de referencia se titula de la misma manera y el título se evalúa sobre la curva de referencia.

El plan mas simple es 2/2, es decir, 2 concentraciones del patrón y 2 concentraciones de muestra, en cambio el plan 3/3 o 4/4 permite verificar los parámetros (linealidad y paralelismo).



En la difusión una caja de petri de 90mm de diámetro en la que se colocan 3 soluciones patrón y 3 soluciones muestra de concentración creciente, es también un bloque. Es preferible colocar las soluciones mas concentradas en solución opuesta a la menos concentradas para no arriesgarse a encontrarla lado a lado después de una disposición aleatoria y evitar así las interacciones y también la confluencias de los halos de inhibición.

Debe de haber una relación cuantitativa en la respuesta obtenida (diámetro del halo de inhibición, densidad óptica) y la concentración del agente microbiano.

La curva respuesta en función de la concentración debe de tener una pendiente satisfactoria, ósea debe de haber una notificación significativa de la respuesta en función de la dosis. La respuesta debe de variar en forma lineal con la dosis. El estándar y la muestra se deben de comportar de igual forma.

Para que el ensayo se considere valido:

- la regresión debe de ser significativa.
- la desviación de la linealidad no debe de ser significativa.
- la desviación del paralelismo no debe de ser significativa.

4.3.1 Diseño 3+3 (Técnica Validada por LNCCM)

Es un método matemático factorial en el que se incluye igual numero de dosis de cada preparación (3 concentraciones del estándar y 3 concentraciones del desconocido) aplicando el análisis de varianza ANOVA.

Se preparan tres soluciones del estándar S1, S2, S3 donde la solución S2 es la dosis media.

En este diseño 3+3 se establecen tres niveles de la solución estándar, se prepara un nivel de la muestra(desconocida),a una concentración igual que el nivel o dosis media del estándar se prepara el nivel medio de la muestra($S_2=D_2$).



4.3.2 Características del diseño.

H preparaciones (patrón y mas de u desconocido).

3 x H tratamientos: 3 dosis del patrón (S₁ S₂ S₃) y dosis de cada desconocido (D₁ D₂ D₃).

Log dosis equiespaciados (relación de dosis constante).

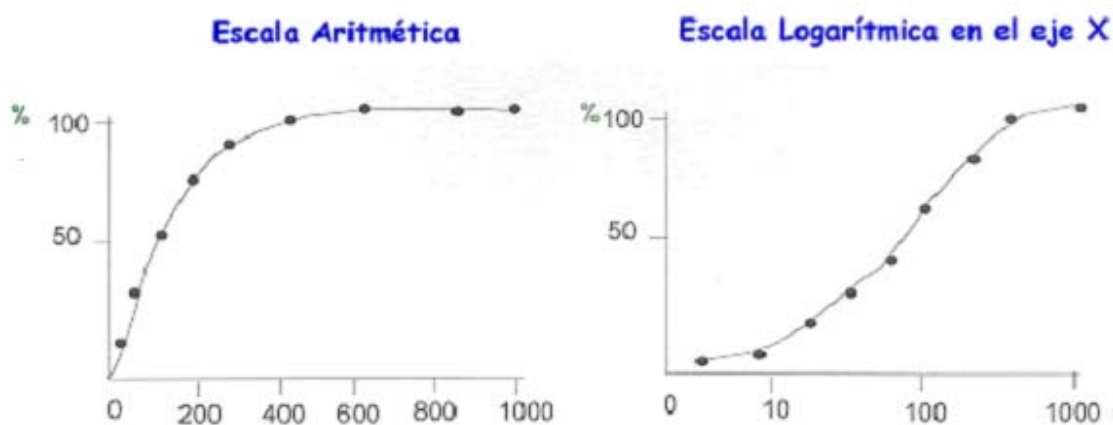
$$S_2/S_1 = S_3/S_2 = D_2/D_1 = D_3/D_2$$

Igual numero de respuestas para cada tratamiento.

4.3.3. Curvas Dosis-Respuestas

Una curva de dosis-respuestas es una representación gráfica de la correlación entre una serie de dosis, consideradas como la variable independiente y por lo tanto representadas en el eje x de coordenadas, y el efecto observado, considerado como la variable dependiente y graficado en el eje y.

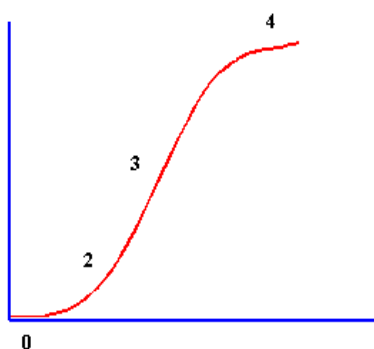
Las curvas de dosis-respuesta pueden tomar diferentes formas de acuerdo a los mecanismos que representan. En algunos casos es posible obtener una mejor representación usando una escala aritmética para la dosis o usando una escala logarítmica para las dosis.





Si se obtiene una respuesta de una magnitud definida para cada dosis, dentro de un rango de dosis, se dice que la respuesta es "gradual". Es decir que a diferentes dosis, D_1, D_2, \dots, D_i , se observan los efectos, S_1, S_2, \dots, S_i , que varían en forma continua y tienen un valor único para cada dosis (dentro de la variabilidad normal que siempre se observa cuando se hacen bioensayos).

La curva dosis-efecto se construye graficando en las ordenadas (S) y en las abscisas (D). La curva pasa por el origen del sistema de coordenadas cartesianas y la pendiente máxima se presenta en el origen. La pendiente permanece aproximadamente constante durante un rango amplio de la dosis (cinética de primer orden), después la pendiente disminuye con la dosis hasta que se vuelve cero (cinética de orden cero) y la respuesta adquiere su valor máximo. A este valor máximo se le denomina efecto máximo (D_{max}) y es una medida de la eficacia del tóxico. En algunas ocasiones, la relación dosis-efecto no es tan definida y dentro de una población se observa una distribución de respuestas para cada dosis. En este caso el efecto que se mide no es la magnitud, se mide el porcentaje de la población en estudio que presenta una determinada respuesta para cada dosis suministrada. Este tipo de efecto se le denomina cuantales. En estos casos se acostumbra graficar, en la ordenada, el por ciento de la población que presenta un determinado valor de la respuesta y en la abcisa, el logaritmo de la dosis suministrada. Esta curva tiene forma sigmoide.



Curva Dosis-Respuesta.



La curva pasa por el origen (cuando la dosis es cero, la respuesta es cero) y a valores muy bajos de la dosis, la curva es horizontal con un valor del efecto igual a cero (la curva va sobre el eje de las dosis). La respuesta empieza a tener un valor mayor que cero cuando la dosis llega al nivel límite. De allí en adelante la pendiente de la curva crece con la dosis, hasta que se llega a una pendiente máxima. Esta pendiente se mantiene por un amplio rango de dosis en que la respuesta es directamente proporcional a la dosis. A dosis mayores la pendiente empieza a decrecer hasta que la curva se vuelve asintótica a un valor máximo de las respuestas.

Las concentraciones teóricas en $\mu\text{g/ml}$ para la Gentamicina son las siguientes: 0.064, 0.080, 0.100, 0.0125, 0.0156. A partir de estas concentraciones se construirá la curva dosis- respuesta de la Gentamicina y se escogerán las 3 concentraciones de trabajo tanto para el estándar como para la muestra.

4.3.4. El análisis de Varianza

La mayoría de los experimentos consisten en el estudio de los efectos de una o más variables independientes sobre una respuesta. Estas variables independientes que pueden controlarse en un experimento se denominan factores.

El análisis de datos generados por un experimento multivariable requiere la identificación de las variables independientes del experimento; estas no solamente serán factores sino que pueden ser también instrucciones para la formación de bloques. La respuesta para un diseño de cuadro latino depende de los factores que representan los tratamientos, pero también es afectada por dos variables cualitativas independientes de los bloques, “filas” y “columnas”

4.3.5. Procedimiento de Análisis de Varianza

Como el nombre lo indica, el procedimiento de análisis de varianza trata de analizar la variación de una respuesta y de asignar porciones (componentes) de esta variación a cada una de las variables de un conjunto de variables independientes. El razonamiento se basa en que las variables de respuesta se modifican por la variación de algún conjunto de variables independientes desconocidas. El objetivo del análisis de varianza es identificar variables



independientes importantes en un estudio y determinar como interactúan y afectan a la respuesta.

4.3.6 ANOVA.

En estadística, **análisis de varianza (ANOVA)** es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

El ANOVA parte de algunos supuestos que han de cumplirse:

- La variable dependiente debe medirse al menos a nivel de intervalo.
- Independencia de las observaciones.
- La distribución de los residuales debe ser normal.
- Homocedasticidad: homogeneidad de las varianzas.

4.3.6.1 Existen tres tipos de modelos:

- El modelo de efectos fijos asume que el experimentador ha considerado para el factor todos los posibles valores que éste puede tomar. Ejemplo: Si el género del individuo es un factor y el experimentador ha incluido tanto individuos masculinos como femeninos, el género es un factor fijo en el experimento.
- Los modelos de efectos aleatorios asumen que en un factor se ha considerado tan sólo una muestra de los posibles valores que éste puede tomar. Ejemplo: Si el método de enseñanza es analizado como un factor que puede influir sobre el nivel de aprendizaje y se ha considerado en el experimento sólo tres de los muchos más métodos posibles, el método de enseñanza es un factor aleatorio en el experimento.



- Los modelos mixtos describen situaciones donde están presentes ambos tipos de factores: fijos y aleatorios.

La técnica fundamental consiste en la separación de la suma de cuadrados (SS) en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo. Como ejemplo, mostramos el modelo para un ANOVA simplificado con un tipo de factores en diferentes niveles. (Si los niveles son cuantitativos y los efectos son lineales, puede resultar apropiado un análisis de regresión lineal).

$$SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Error}} + SS_{\text{Factores}}$$

El número de grados de libertad (gl) puede separarse de forma similar y se corresponde con la forma en que la distribución chi-cuadrado describe la suma de cuadrados asociada.

$$gl_{\text{Total}} = gl_{\text{Error}} + gl_{\text{Factores}}$$

4.3.6.2 Modelo de efectos fijos

El modelo de *efectos fijos* de análisis de la varianza se aplica a situaciones en las que el experimentador ha sometido al grupo o material analizado a varios factores, cada uno de los cuales le afecta sólo a la media, permaneciendo la "variable respuesta" con una distribución normal.

4.3.6.3 Modelo de efectos aleatorios

Los modelos de *efectos aleatorios* se usan para describir situaciones en que ocurren diferencias incomparables en el material o grupo experimental. El ejemplo más simple es el de estimar la media desconocida de una población compuesta de individuos diferentes y en el que esas diferencias se mezclan con los errores del instrumento de medición.



4.3.6.4 Grados de libertad

Por *grados de libertad* entendemos el número efectivo de observaciones que contribuyen a la suma de cuadrados en un ANOVA, es decir, el número total de observaciones menos el número de datos que sean combinación lineal de otros.

4.3.6.5 Pruebas de significación

El análisis de varianza lleva a la realización de pruebas de significación estadística, usando la denominada distribución F de Snedecor.

Fuente de variación	GL	SS	MS
1° factor	$a - 1$	SSA	$SSA/(a - 1)$
2° factor	$b - 2$	SSB	$SSB/(b - 1)$
Interacción	$(a - 1)(b - 1)$	SSAB	$SSAB/(a - 1)(b - 1)$
Error	$ab(n - 1)$	SSE	$SSE/ab(n - 1)$
Total	$abn - 1$	SST	-----



4.4 Medidas de Dispersión

Las medidas de dispersión son parámetros estadísticos que miden cómo de diseminados se encuentran los datos de una distribución. Los más utilizados se refieren al grado de lejanía de los datos respecto a la media y son la desviación media, la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación.

Las medidas de dispersión muestran la variabilidad de una distribución, indicando por medio de un número si las diferentes puntuaciones de una variable están muy alejadas de la media. Cuanto mayor sea ese valor, mayor será la variabilidad, cuanto menor sea, más homogénea será a la media. Así se sabe si todos los casos son parecidos o varían mucho entre ellos.

4.4.1. La desviación estándar (o desviación típica)

Es una medida de dispersión para variables de razón (ratio o cociente) y de intervalo, de gran utilidad en la estadística descriptiva. Es una medida (cuadrática) que informa de la media de distancias que tienen los datos respecto de su media aritmética, expresada en las mismas unidades que la variable.

4.4.1.1. Interpretación y aplicación

La desviación estándar es una medida del grado de dispersión de los datos del valor promedio. Dicho de otra manera, la desviación estándar es simplemente el "promedio" o variación esperada con respecto de la media aritmética.

Una desviación estándar grande indica que los puntos están lejos de la media y una desviación pequeña indica que los datos están agrupados cerca a la media.

La desviación estándar puede ser interpretada como una medida de incertidumbre. La desviación estándar de un grupo repetido de medidas nos da la precisión de éstas. Cuando se va a determinar si un grupo de medidas está de acuerdo con el modelo teórico, la desviación estándar de esas medidas es de vital importancia: si la media de las medidas está demasiado



alejada de la predicción (con la distancia medida en desviaciones estándar), entonces consideramos que las medidas contradicen la teoría. Esto es coherente, ya que las mediciones caen fuera del rango de valores en el cual sería razonable esperar que ocurrieran si el modelo teórico fuera correcto. La desviación estándar es uno de tres parámetros de ubicación central; muestra la agrupación de los datos alrededor de un valor central (la media o promedio).

La desviación típica o desviación estándar, σ , es la raíz cuadrada de la varianza:

$$\sigma = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{x}^2}$$

La razón de ser de este parámetro es conseguir que la medida de dispersión se exprese en las mismas unidades que los datos a los que se refieren.

4.4.2. El coeficiente de variación (C.V.)

El coeficiente de variación es útil para comparar dispersiones a escalas distintas pues es una medida invariante ante cambios de escala. Por otro lado presenta problemas ya que a diferencia de la desviación típica este coeficiente es variable ante cambios de origen. Por ello es importante que todos los valores sean positivos y su media de por tanto un valor positivo.

Exigimos que: $\bar{x} > 0$

Es el cociente entre la desviación típica y la media de la distribución:

$$C. V. = \frac{\sigma}{\bar{x}}$$

Este parámetro sirve para relativizar el valor de la desviación típica y así poder comparar la dispersión de dos poblaciones estadísticas con gamas de valores muy discretas.



4.5. Material de Laboratorio

En el laboratorio hay distintos tipos de materiales: vidrio, plástico, porcelana pero ninguno de ellos cumple las exigencias del laboratorio. Se tendrá que elegir en cada momento el material según el uso que le queramos dar, ningún utensilio es perfecto.

El vidrio se caracteriza porque tiene mucha resistencia química (frente a ácidos, frente a bases), tiene mayor resistencia que el plástico, es muy estable, se caracteriza por su transparencia.

Todos los vidrios no son perfectos para todas las técnicas, a veces se necesitan vidrios con resistencia térmica, con resistencia mecánica. Según el uso que le queramos dar aparecen vidrios especiales. La mayoría de los utilizados son vidrios borosilicatados, los cuales ofrecen gran resistencia térmica (vidrio pirex, quimax). Cuando se emplea el material de vidrio hay que tomar unas precauciones:

- No los podemos someter a cambios bruscos de temperatura (se provocan tensiones que pueden romper el cristal).

Hay que colocar la estufa de secado o esterilización en frío, ir calentándolo después, y cuando acaba el tiempo de secado dejar enfriar el material

- No se debe aplicar fuerza sobre llaves, tapones de vidrio

- No se debe someter a variaciones bruscas de presión

- No se debe conservar soluciones concentradas de bases en material de vidrio de borosilicato, porque son sustancias muy cáusticas que pueden destruir la calibración del aparato.



4.5.1. VIDRIO BOROSILICATO

El borosilicato, o silicato de boro, es un material componente de vidrios que se emplean extensamente en instrumentos ópticos por sus buenas propiedades ópticas, pero también mecánicas (baja dilatación). Los vidrios de borosilicato se fabrican mediante la sustitución de grandes cantidades de álcali y, con frecuencia, de toda la cal, con B_2O_3 . Aunque este último producto es un formador de redes (y no modificador sustituyente), reacciona también con el SiO_2 , casi de la misma forma que el sodio y la cal, que son modificadores. La materia prima es el bórax, tetraborato de sodio, que al calentarlo da trióxido de boro. El uso de B_2O_3 reduce el coeficiente de dilatación, por lo que la resistencia de estos vidrios a los choques térmicos es muy superior a la de los sodocálcicos. Además, la reducción de la cantidad de alcalinos presente hace mejor la no reactividad de dicho vidrio. El Pyrex es una marca comercial común para el vidrio de borosilicato. Su composición media es: 80% SiO_2 , 4% Na_2O , 12% B_2O_3 , 3% Al_2O_3 , 0.4% CaO , 0.6% K_2O . Se utiliza para instrumentos de laboratorio, utensilios de cocina, tuberías para productos químicos y sellos metálicos de baja dilatación. Aunque el vidrio es un mal conductor térmico, transmite aproximadamente un 95% del calor irradiado que recibe.

4.5.1.1. CARACTERÍSTICAS

Composición Química:	%
Silice (SiO_2)	80,4
Alúmina (Al_2O_3)	2,4
Anhidrido Bórico (B_2O_3)	13,0
Hidroxido Sódico (Na_2O)	3,9
Resto de elementos:	%
$AsO_3 + Sb_2O_3$	0,001
PbO	0,1
MgO	0,1
ZnO	0,1
CaO	0,3
K_2O	0,3
BaO	0,2



El vidrio de borosilicato cumple los principales estándares internacionales para su uso en laboratorio, siendo apropiado para su calentamiento incluso a la llama.

4.5.2. Calibración del Material de Laboratorio.

La calibración se define como el “conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada y los correspondientes valores conocidos de una magnitud de medida”.

La calibración, es el procedimiento metrológico que permite determinar con suficiente exactitud cuál es el valor de los errores de los instrumentos de medición. Y es de vital importancia que dichos errores sean lo suficientemente pequeños y que hayan sido determinados con la mayor exactitud posible.

Cuando se quiere la máxima exactitud en un determinado análisis debemos empezar por la calibración, suele hacerse midiendo el agua vertida por el recipiente o contenida en el, también se puede utilizar la densidad de ese líquido para convertir la masa en volumen o con un factor de corrección, tomando en cuenta que el líquido usado sea agua destilada, la cual se expande 0.02% por grado en la densidad de los 20 °C.

El vidrio se expande o se contrae ya sea las condiciones de la temperatura, si sometemos el material de vidrio a temperaturas muy elevadas las moléculas del vidrio se expanden, mientras que si lo sometemos a muy bajas temperaturas las moléculas del vidrio se contraen, descalibrando de esta manera el material de vidrio. Es por eso que se debe trabajar a temperaturas relativas a la cual fue hecho el material.



4.6. Métodos de Esterilización

La esterilización puede definirse como la ausencia de todas las formas de vida viable. En la práctica la muerte de un microorganismo se alcanza cuando no es posible detectarlo en un medio de cultivo en el cual ha mostrado que es capaz de proliferar.

El término de Esterilidad se expresa como la probabilidad matemática de que un producto permanezca contaminado con microorganismos supervivientes después de haber sido expuesto a un proceso de esterilización.

4.6.1. Clasificación de las técnicas de Esterilización

La Esterilización se puede seguir mediante el empleo de distintos procesos. La elección de la técnica mas apropiada depende de las condiciones de estabilidad del producto que va a ser sometido a esterilización.

- Esterilización por Agentes Físicos.
- Esterilización por Agentes Químicos.

La esterilización por Agentes Físicos se clasifica en:

Esterilización por calor: Para esta técnica depende de la temperatura alcanzada y del tiempo de exposición. En función de la presencia o no de agua en el medio, este tipo de esterilización puede dividirse en esterilización por calor húmedo o por calor seco.

4.6.1.1. Esterilización por Calor Húmedo:

Su eficacia para lograr la inactivación de los microorganismos depende de la temperatura alcanzada, del tiempo de exposición, y de la presencia o ausencia del agua en el medio, el calor puede producir la muerte del microorganismo mediante cambios en la estructura química. La muerte de los microorganismos se puede atribuir a la coagulación y desnaturalización de sus proteínas esenciales.



Equipo de esterilización por calor húmedo:

Agua hirviendo (100°C)

Tindalización

Esterilización bajo presión

4.6.1.2. Esterilización por Calor Seco

Es el método de elección para la esterilización de productos estables al calor pero sensibles a la humedad. Las temperaturas y los tiempos necesarios para este proceso son superiores al método de esterilización por calor húmedo. Este proceso es el de elección en la esterilización de ceras de aceite, parafinas, glicerol en general de todos aquellos fluidos no acuosos estables al calor. También se emplea en la esterilización de materiales de cura con algodón y gasas, es utilizado para la preparación de productos estériles, materiales de vidrio, ampollas, viales y frascos.

Equipos:

- Flameado
- Horno o estufa de calor seco
- Túnel de esterilización y despirogenozación

Esterilización por radiaciones: En función del tipo de radiación, estos procesos se clasifican en esterilización por radiaciones ultravioleta y en esterilización por radiaciones ionizantes.

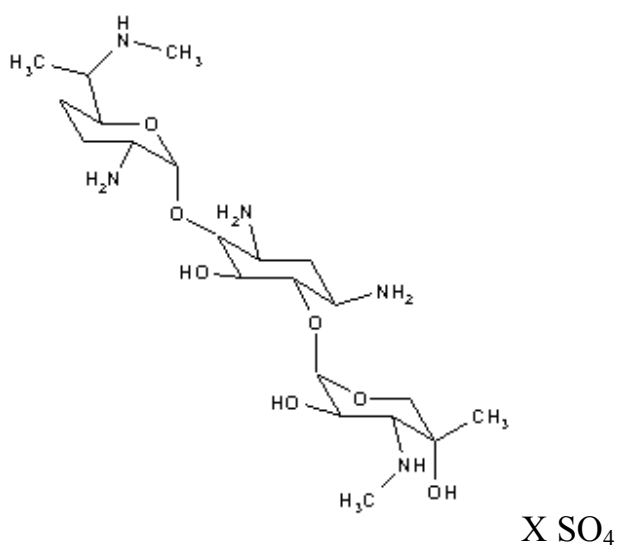
Esterilización por filtración y manipulación aséptica: este proceso de esterilización se emplea en aquellos casos en que el producto que se va a tratar no puede ser expuesto a procesos de esterilización por calor o radiaciones.



La esterilización por Agentes Químicos se realiza principalmente mediante el empleo de agentes gaseosos. Entre los más empleados hay que destacar el Oxido de Etileno, la betapropiolactona y el formaldehído.

4.7 Propiedades Físico-Químicas

GENTAMICINA, SULFATO.



- La inyección de Gentamicina contienen una cantidad de sulfato de Gentamicina equivalente a no menos del 90% y no más del 125% de la cantidad de Gentamicina declarada en la etiqueta. Puede contener amortiguadores de pH, conservantes y agentes complejantes adecuados.
- Tienen una Potencia equivalente a no menos de 590 μ g de gentamicina por mg, calculado con respecto a la sustancia seca.
- pH: 3-5.5
- Descripción: polvo blanco o ligeramente pardusco.
- Solubilidad: soluble en agua, insoluble en alcohol, acetona, benceno.



5. DISEÑO METODOLÓGICO



5.1 Tipo de estudio: Experimental.

Universo: Gentamicina.

Población: Inyectables de Gentamicina lote NHR.

Muestra: 20 inyectables de Gentamicina lote NHR.

Área de Estudio: El presente estudio fue realizado, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, en el departamento de control microbiológico del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos. (LNCCM), MINSA. Managua.

Criterios: Los criterios utilizados en la selección de la muestra fueron:

- Productos que con mayor frecuencia llega al LNCCM por parte del CIPS.
- Medicamento con elevada prescripción en el Área Clínica del Ministerio de Salud.
- Es un producto que se analiza por el método cilindro en placa.

5.2 Operacionalización de las Variables:

Variable	Concepto	Indicador	Medida
Temperatura	La temperatura es un parámetro físico descriptivo de un sistema que caracteriza el calor, o transferencia de energía térmica.	0 – 180° C	Grado centígrado registrado.
Tiempo de Incubación	Periodo en que los medios de cultivos permiten el crecimiento de microorganismo.	24-48 horas.	Horas.
Contaminación de Medios de Cultivos, Agar y Caldos.	Contaminación por microorganismos ajenos al ensayo de potencia microbiológica.	Colonia atípica que no sean pequeñas color blancas.	Numero de unidades formadoras de Colonias.



5.3 Procedimiento: Para desarrollar el trabajo investigativo se inicio con una revisión bibliográfica en diferentes fuentes de información, biblioteca del complejo docente de la salud, Laboratorio de Control de Calidad de Drogas y Medicamentos de UNAN-León, información de Internet, etc.

La parte experimental de nuestro trabajo se inicio con la elaboración de un listado de la cristalería a utilizar, a continuación se procedió al lavado de cristalería nueva, siguiendo las instrucciones de un PNT proporcionado por el departamento.

Posteriormente se procedió a preparar medios de cultivo, preparar Buffer y estándar primario de Gentamicina USP. Luego se trabajo en la Caracterización de la Cepa (Cepa trabajo: *St. epidermidis*) para verificar que no hubiera contaminación (Agar Sangre de Carnero, Agar Manitol). Posteriormente se realizo el ensayo de Estabilidad Bioquímica de la cepa microbiana y el siguiente paso fue trabajar en el Mantenimiento de cepas (Ensayo Preparación del Inoculo del Microorganismo de prueba) a utilizar en los ensayos de potencia de Gentamicina.

El departamento de microbiología nos proporciono el patrón primario y un total de 20 ampollas de Gentamicina (80mg/2ml) para realizar los cálculos del estándar y de la muestra a las concentraciones proporcionadas por el departamento. Las concentraciones de trabajo estandarizadas para el ensayo de potencia de antibiótico de gentamicina por el método Cilindro-Placa fueron: 0.19584, 0.39168, 0.78336 μ g/ml. A partir de estas concentraciones preparamos las diluciones del estándar y de la muestra proveniente de la solución STOCK.

Se procedió a depositar la capa base y a inocular la capa siembra en las placas, se colocaron los cilindros, se llenaron los mismos con el estándar y la muestra, se incubaron por 18 horas. Se retiro con una pinza estéril lo cilindros, se realizaron las lecturas de los halos con el lector de zona y se efectuó el análisis de datos con un programa estadístico de análisis de varianza por ANOVA.



Se llevo a cabo un total de 4 ensayos de potencia de gentamicina, 2 ensayos esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo y 2 ensayos esterilizando todo el material volumétrico, los ensayos se efectuaron en días diferentes por 2 analistas diferentes.

5.4 Efectuar el ensayo de la siguiente manera:

1. Se realiza el ensayo de potencia de gentamicina con material volumétrico no esterilizado excepto la que esta en contacto con el microorganismo de prueba.

Iniciar con lavar la cristalería nueva. **VER ANEXO No. 1.**

Proceder con la preparación de medios de cultivo. **VER ANEXO No.2.**

Preparar el Buffer. **VER ANEXO No.3.**

Realizar la técnica de Caracterización de la cepa. **VER ANEXO No.4. Y No. 16**

A continuación se realizara la estabilidad bioquímica de la cepa microbiana:

1.1. Estabilidad Bioquímica de Cepa Microbiana utilizada en Potencia de Antibiótico. VER ESQUEMA EN ANEXO No.5.

El procedimiento es el siguiente:

Sacar de la nevera la cepa original media hora antes de realizar el primer pase.

1. Colocar en una gradilla un tubo de ensayo que contenga 9.5 ml de Caldo BHI o Caldo Tripticasa Soya Estéril y rotular con la siguiente nomenclatura. Cultivo primario de trabajo.
2. Una vez que la Cepa Original tiene aproximadamente la temperatura ambiente, tomar 1 o 2 asadas utilizando una asa redonda e inocular en el tubo conocido como: Cultivo primario de trabajo, incubar por 24 horas en condiciones adecuadas para el microorganismo.



3. Proteger la parte superior del frasco que contiene la Cepa Original colocando parafilm.
4. Regresar el frasco que contiene la cepa original a la nevera.
5. Una vez finalizado el tiempo de incubación del cultivo primario de trabajo proceder a los siguientes pasos.
6. Colocar en una gradilla 4 tubos de ensayo que contengan Agar Antibiótico número 1 inclinado estéril.
7. Rotular los tubos de la siguiente manera:
 - 7.1. Subcultivo de trabajo 1
 - 7.2. Subcultivo de trabajo 2
 - 7.3. Subcultivo de trabajo 3
 - 7.4. Subcultivo de trabajo 4
8. Del cultivo primario de trabajo, tomar 2 o 3 azadas, utilizando un asa redonda estéril e inocular a los tubos marcando como: Subcultivo de trabajo 1, Subcultivo de trabajo 2, Subcultivo de trabajo 3, Subcultivo de trabajo 4. Incubar por 24 horas en condiciones adecuadas para el microorganismo.
9. Descartar el tubo conteniendo el cultivo primario de trabajo.
10. Una vez finalizado el tiempo de incubación del Subcultivo 1, 2, 3 y 4 proceder a:
11. Guardar en la nevera los Subcultivo de trabajo 1, 2, 3 y 4.

12. Solamente para el día del ensayo de potencia

- 12.1. Colocar en una gradilla 2 tubos de ensayo que contenga Agar Antibiótico # 1.
- 12.2. Rotular los tubos de la siguiente manera:

Siembra A

Siembra B



13. Del subcultivo de trabajo 1, tomar 2 o 3, asadas utilizando una asa redonda estéril e inocular a los tubos marcados como: Siembra a, Siembra b, incubar por 24 horas en condiciones adecuadas para el microorganismo.
14. Descartar el tubo conteniendo el Subcultivo 1.
15. Una vez finalizando el tiempo de incubación de la siembra (a) y siembra (b), proceder a la preparación de suspensión de microorganismo y luego descartarlas.
16. Si se requiere preparar suspensión microbiana proceder de la siguiente manera;
17. Sacar de la nevera el subcultivo de trabajo 2
18. **Repetir los pasos:** 12.1, 12.2, 13, 14, 15.
19. Si se requiere preparar nuevamente la suspensión microbiana proceder de la siguiente manera:
20. Sacar de la nevera el Subcultivo de trabajo 3 y 4
21. **Repetir los pasos:** 12.1, 12.2, 13, 14, 15.
22. Se debe tomar en cuenta que el tiempo de almacenamiento en refrigeración de los subcultivo no debe exceder el mes. Si no se utilizan descartar los tubos.

Se continúa con la preparación del Inoculo:



Preparación del Inoculo del Microorganismo de Prueba. VER ESQUEMA DEL ANEXO No.6.

Se realiza de la siguiente manera:

1.2. Preparación de la suspensión del microorganismo. VER ANEXO No.7.

1. Seleccionar el microorganismo de prueba para cada antibiotico.
2. De la cepa que esta bajo refrigeración, subcultivo de trabajo, tomar un tubo de microorganismo seleccionado, que tenga la fecha mas reciente no mayor de 1 mes.
 - 2.1 Tomar de refrigerador:
 - Agar antibiótico No 1 inclinado 3 tubos, a excepción para la potencia de gentamicina 2 tubos.
 3. Rotular los tubos: con los siguientes datos:
 - Nombre del microorganismo y ATCC.
 - Fecha de pase.
 - Firma del analista.
 4. Pasar 2-3 asadas del cultivo seleccionado a los tubos rotulados anteriormente agar antibiótico número 1.
 5. Incubar: antibiótico No. 1 30-35 °C
 6. Sacar del incubador antibiótico No.1 inclinado con crecimiento del microorganismo de 24 horas.
 7. Anotar en el cuaderno de preparación de estandarización de suspensiones del microorganismo de prueba, los siguientes datos:
 - Nombre del microorganismo



- ATCC
- Fecha de preparación
- Firma del analista
- Factor de dilución práctico
- Número de tubos utilizados: Antibiótico. No 1
- Cantidad de solución salina utilizada (ml)
- Fecha de vencimiento
- Firma del analista
- Porcentaje de transmitancia

8.1 Rotular el tubo para realizar la dilución práctica, anotar los siguientes datos:

- Nombre del microorganismo
- ATCC
- Factor de dilución práctica

Ejemplo Teórico 1:14(ml), para obtener el 25% T

Práctico 0.5ml; 6.5ml

8.2 Potencia de gentamicina: es exclusivo para este antibiótico.

8.2.2 Rotular el tubo donde se va a hacer la dilución práctica de trabajo que se utiliza en el ensayo, anotar los siguientes datos:

- Nombre del microorganismo
- ATCC



- Dilución 1: 9ml

9. Con una pipeta estéril agregar 2 - 20ml solución salina estéril 0.9% al tubo o frasco con crecimiento del microorganismo de 24 horas.

En caso de potencia de gentamicina se utilizará 1 tubo y se deberá agregar 12ml de solución salina.

9.1. Al tubo de dilución práctica agregar el volumen sugerido de solución salina, para obtener el 25%T.

9.2 Al tubo de dilución (1:10ml) que se utiliza para el ensayo, agregar 9ml de solución salina estéril, solamente para potencia de gentamicina.

9.3. A dos celdas agregar 4-8 ml de solución salina 0.9% estéril para blanco/spectronic.

10. Esterilizar el asa redonda y dejar enfriar.

10.1. Introducir con mucho cuidado el asa en el tubo o frasco donde está el crecimiento del microorganismo procurando no rozar la parte externa y desprender toda la masa.

10.2. Depositar toda la masa obtenida del desprendimiento en el erlenmeyer que esta rotulado (inciso 8), esto se conocerá como solución madre de microorganismo. Una vez utilizado se guardara en refrigeración hasta la fecha de vencimiento.

10.2.1 Si la solución madre de microorganismos no va a utilizarse el mismo día de su recolección, proceder a guardar bajo refrigeración hasta el día del ensayo (antes de su fecha de vencimiento).

Ejemplo: para el resto de antibióticos se realizará el siguiente cálculo:

Inoculo teórico 0.4ml -----25% T

X -----62.5% T Lectura practico / 100ml medio de cultivo



10.3 Agitar manualmente el erlemeyer con cuidado de no salpicar la retapa, en caso de erlemeyer con tapón de rosca la agitación se hará eléctrico.

10.4 Con pipeta estéril de 1ml tomar de la solución madre del microorganismo el volumen sugerido al tubo de dilución práctica que contiene la solución salina. (Inciso 8.1)

Ejemplo:

0.5 ml microorganismo / 6.5ml solución salina

10.5 Con la misma pipeta estéril tomar de la solución madre de microorganismo el volumen sugerido al tubo de dilución práctica que contiene la solución salina (inciso 8.2 y 8.2.2) dilución 1:10 ml ese tubo se utilizará para el ensayo de potencia de gentamicina exclusivamente.

1.1 Una vez utilizado el erlemeyer que contiene la solución madre del microorganismo, guardar en refrigeración para evitar confusiones.

11.1 Descartar la solución madre de microorganismos hasta concluir la fecha de vencimiento.

B. Estandarización de la suspensión de microorganismo:

1. Agitar de dilución práctica

Ejemplo:

0.5ml microorganismo: 6.5ml de solución salina.

2. Ver procedimiento operativo de spectronic (UV- 1700) shimazu.

2.1 Leer en el espectrofotómetro a 580nm, el porcentaje de transmitancia (aproximadamente el 25%).

3. Blanquear utilizando 2 celdas que contiene solución salina estéril 0.9% hasta obtener 100%T

3.1 Dejar la celda del fondo y sacar la otra.



4. Agregar a la celda 4.8-8ml de la solución práctica (tubo rotulado 0.5ml-6.5ml).

5. Descartar la dilución práctica (tubo rotulado 0.5ml-6.5ml).

5.1 Descartar los tubos de agar antibiótico No 1, sobrante con crecimiento de 24 horas.

6. Con este dato determinar el inóculo del microorganismo de prueba que se debe añadir a 100ml de agar difundido, mediante una regla de 3.

6.1 Anotar en el cuaderno o bitácora (potencia de antibióticos) del analista los siguientes datos:

- Fecha
- Nombre del microorganismo
- ATCC
- % T (práctico)
- Inoculo teórico.

Ejemplo: 0.03ml-100ml medio de cultivo (25% T)

0.03ml ----- 25 % T

X ----- 76.8 T práctico

X= 0.092ml

7.1 Solamente para potencia de gentamicina:

Por el factor de dilución se multiplicador 10 (1:10)

Ejemplo: 0.092ml suspensión de microorganismos x 10= 0.92ml/ 100ml del medio fundido.



1.3. Procedimiento estandarizado de Potencia de Antibiótico mediante el método Cilindro-Placa (3+3). VER ANEXO No. 8.

Preparación del Patrón.

Para preparar la solución de patrón primario, si la monografía del patrón no indica otra cosa, secar según las especificaciones establecidas y pesar una cantidad exacta de la sustancia de referencia y realizar las diluciones de referencia con los solventes y concentraciones indicadas para cada antibiótico que en total representan 3 diluciones (S3, S2, S1). Almacenar en un refrigerador la primera dilución de referencia, usarlo dentro del periodo indicado.

Preparación de la muestra.

De la información que se tenga de la muestra, asignarle una concentración teórica por unidad de peso o volumen y en base a este dato, preparar el día de las pruebas las diluciones como se especifican para cada antibiótico que en total representan 3 diluciones (D3, D2, D1) con un valor teórico igual a las del patrón.

Preparación de capa base.

Con ayuda de una pipeta serológica de 25ml, agregar la cantidad de medio fundido a cada plato petry según Farmacopea. ANEXO No. 10

Distribuir el medio por todo el fondo del plato, colocar la tapa, dejar solidificar. Una vez endurecido el medio incubar por 15 minutos de 35-37°C, para evitar el agua condensada.

Colocar la capa siembra.

Preparación de capa Siembra.

Fundir y enfriar a 42°C una cantidad suficiente del medio de cultivo necesaria para todas las placas. Mantener siempre en baño termostático a temperatura constante.

Agregar el inóculo sugerido de la suspensión del microorganismo de ensayo al medio de cultivo.



Agitar el frasco haciéndolo girar, para obtener una suspensión homogénea del microorganismo.

Agregar a cada placa la cantidad indicada del medio inoculado (5 ml) inclinando el plato hacia atrás y el frente para distribuir el agar inoculado en forma uniforme sobre la capa base (trasladar a baño maría el medio de cultivo para esta operación en el lugar de la mesa).

Dejar solidificar la capa siembra.

Colocar inmediatamente sobre la superficie del agar inoculado 6 cilindros en cada placa de forma manual auxiliándose de una pinza y asegurándose que quede un espacio 2-3 mm del medio y de no colocarlo de forma fuerte, ni brusca, cubrir los platos posteriormente para evitar contaminación. Dejar 5 minutos en reposo y proceder al llenado de los cilindros el cual debe ser de 170 μ l.

Para llenar los cilindros se realiza el siguiente procedimiento:

En el análisis se usa un total de 10 platos. En cada plato se llena 3 cilindros alternos con las diluciones de referencia (S1, S2, S3) y los otros 3 cilindros con las diluciones de las muestras (D1, D2, D3). VER ANEXO No. 17.

El llenado de los cilindros de los cinco primeros platos se debe hacer con una pipeta automática (cambiando la punta para cada concentración) siguiendo el siguiente orden:

Dilución S1 vs. D1

Dilución S2 vs. D2

Dilución S3 vs. D3

Proceder al llenado de los cinco platos restantes y cambiar la punta de la pipeta para cada concentración según el siguiente orden:

Dilución D1 vs. S1

Dilución D2 vs. S2

Dilución D3 vs. S3



Obtención de los resultados:

Quitar los cilindros, medir los halos de inhibición usando lector de zona, anotar los diámetros de cada zona de inhibición y procesar los datos para el diseño 3+3 utilizando un programa: para ensayo indirecto cuantitativo rectas paralelas con análisis de varianza.

2. Realizar la caracterización de la cepa control de *St. epidermidis* con pases al Agar Sangre de Carnero y Agar Manitol:

Se realizó el siguiente procedimiento:

1. Esterilizamos el asa redonda con ayuda de un mechero.
2. Con el asa redonda tomamos una o dos asadas del caldo BHI.
3. Realizamos un estriado en la placa que contenía el agar sangre de carnero.
4. Invertimos la placa.
5. Incubamos a una temperatura de 30-35 °C por 24 horas.
6. Esterilizamos el asa redonda con ayuda de un mechero.
7. Con el asa redonda tomamos una o dos asadas del caldo BHI.
8. Realizamos un estriado en la placa que contenía el agar manitol.
9. Invertimos la placa.
10. Incubamos a una temperatura de 30-35 °C por 48 horas.



Efectuar estabilidad bioquímica de la cepa microbiana (**ver procedimiento 1.1.**).

3. Verificar la ausencia de microorganismos contaminante en el agar utilizado para el ensayo microbiológico de gentamicina, se efectúa el aislamiento en agar sangre de carnero y agar manitol.

Seguir el siguiente procedimiento:

Se iniciará con la preparación de los medios de cultivo correspondiente.

A continuación se procederá al aislamiento de la cepa contenida en la capa siembra de la siguiente manera:

Tomar 2-3 asadas usando asa redonda de agar contenido en las placas del ensayo de Gentamicina y aislarla en agar sangre de carnero y manitol. Incubar invirtiendo las placas de 24 - 48 horas. Observar el crecimiento de colonias en las placas, realizar Tinción de Gram y registrar los resultados. Esperando obtener solamente presencia de colonias redondas Gram Positiva agrupadas en racimos.

4. Para cumplir con los criterios de aceptación del diseño experimental.

El diseño experimental estará basado en un análisis estadístico de ANOVA de dos factores. Para cumplir con los criterios se hará el siguiente procedimiento: una vez recopilado los datos de los ensayos de potencia de Gentamicina, se someterán al test estadístico de Anova para verificar que cumplen con los criterios de aceptación. Los ensayos deben cumplir con estos criterios para considerarse validos.

Regresión <0.01

Desviación del paralelismo >0.05

Curva Combinada >0.05

Curva Opuesta >0.05



5. Comparación de los resultados obtenidos del ensayo de potencia esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo y el ensayo de potencia esterilizando todo el material volumétrico y veremos si nuestro método satisface las expectativas esperadas.

Para efectuar esta comparación se tomarán los resultados de ambos ensayos, no deben de haber contaminación de microorganismos ajenos. Calcularemos el promedio, luego lo someteremos a medidas de dispersión como son: la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los ensayos se considerarán válidos si están dentro del rango de la desviación estándar para ensayos microbiológicos (D.E. <5%)

6. Procedimos a la calibración de balones de 25ml sometido a esterilización y no sometido a esterilización para determinar la influencia de la temperatura en las moléculas del vidrio y de esta manera verificar el margen de error de los balones facilitado por el MINSA. VER ANEXO No. 9.



5.5. MATERIAL Y EQUIPOS.

Material:

Los materiales usados para realizar en el estudio se describen en la tabla siguiente y se han clasificado en materiales sometidos a esterilización y materiales no sometidos a esterilización para facilitar su comprensión.

Material de Laboratorio Esterilizado	Material de Laboratorio no Esterilizado
Plato petry de vidrio 100mm x 20mm.	Balones. 10ml, 25ml, 50ml, 100ml Kimax, Assistant, Pirex.
Cilindro de acero inoxidable: diámetro externo 8mm, diámetro interno 6mm y longitud 10mm.	Pipeta Pasteur: 1000 μ l.
Pipetas serológicas Assistant: 1, 2, 5, 11, 25 ml.	Pipetas serológicas Assistant: 1, 2, 5ml.
Botellas de dilución de 160ml.	Pipeta automática VOLAC serie 99080414 volúmenes range 40-200 μ l.
Tubos de ensayo de vidrio con rosca 125mm x 25mm.	Probetas: 50ml, 100ml.
Pinza de acero inoxidable	Celdas de cuarzo.
Puntas de pipeta automática volar.	
Pipeta Pasteur.	



Equipos:

Espectrofotómetro UV- visible 1700 doble celda SHIMADZU serie: A11024234339 CS.

Lector de zona de inhibición FISHER modelo 290 serie: 126.

Microscopio binocular, NIKON serie 518926.

Microscopio binocular, NIKON serie 518926.

Balanza analítica OHAUS GA 200D serie 2078.

Esteroscopio REICHERT modelo 650 serie: 18694-2.

Vortex Genie 2 scientific industries serie 158719.

Agitador magnético con hotplate marca selecta serie: 0453718.

pH metro Grison modelo GLP-22 serie 431017.

Incubadora crema de 1 puerta para medio de cultivo marca 2. Precisión scientific modelo 4L.

Autoclave P- selecta para descontaminar modelo 4047725 serie 0453696.

Autoclave para esterilizar medios de cultivo, YAMATO modelo 5m510 serie 1800299-6286.

Horno gris celeste para esterilizar cristalería marca: RAYPA modelo DO-90 serie 50467.

Incubadora de 1 puerta precisión scientific serie 9604-0116.

Exhibidor FOGEL para mantenimiento de reactivos y ceparios.

Horno al vacío marca FISHER scientific modelo 281.

Bomba al vacío ILMVAC.

Baño maría.

Mechero Bunsen.



Material de descarte:

Algodón, Papel de aluminio, Papel toalla, Gorros, Guantes, Naso buco, Papel pH.

Otros materiales:

Lápiz graso, Marcadores, Termómetro, Espátulas.

Reactivos:

Azul de bromotimol.

Safranina.

Lugol.

Alcohol cetona.

Cristal violeta.

HCL 1 %.

NAOH 1%.

Agua destilada.

Acido fosforito 18 N.



6. RESULTADOS



Después de haber realizado el Ensayo de Potencia de Antibiótico por el método Cilindro-Placa usando como muestra Gentamicina Sulfato, esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo de trabajo y el otro método en que se esteriliza toda la cristalería, se generaron los siguientes resultados:

Al realizar el ensayo de potencia de antibiótico esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de trabajo observamos:

En los medios que se encontraban en las placas se formaron halos sin presencia de colonias contaminantes observando solamente el crecimiento de *St. epidirmidis*. VER ANEXO No. 13.

De 22 placas petri utilizadas se contaminó 1 placa, se le realizó prueba de Tincion de Gram revelando la presencia de bacilos gram (-) largos y gruesos.

Las muestras de Gentamicina Sulfato cumplen con las especificaciones de la Monografía USP:

Se encuentran dentro del límite de tolerancia declarado en la monografía oficial siendo de no menos del 90% y no más del 125%.

Las muestras de Gentamicina se encuentran dentro de los límites inferior y superior de la potencia de antibióticos.

Al realizar el ensayo de potencia de antibiótico esterilizando todo el material volumétrico encontramos iguales resultados a los anteriormente descritos.

En los medios que se encontraban en las placas se formaron halos claros y de circunferencia bien definidos y solamente con presencia de *St. epidermidis* VER ANEXO No. 13.

Las muestras de Gentamicina Sulfato cumplen con las especificaciones de la Monografía USP:

Se encuentran dentro del límite de tolerancia declarado en la monografía oficial siendo de no menos del 90% y no más del 125%.

Las muestras de Gentamicina se encuentran dentro de los límites inferior y superior de la potencia de antibióticos.



Para verificar la presencia de *St.epidermidis* se realizó tinción de gram, siembra en agar sangre de carnero y agar manitol (Caracterización de la Cepa Trabajo). Obteniendo resultados positivos para cada una de las pruebas. VER ANEXO No. 14.

TABLA No.1 Caracterización de Cepa inicial.

Organismo de prueba	Tinción de Gram	Agar Sangre Carnero	Agar Manitol
<i>St. epidermidis</i> ATCC 12228	Colonias moradas en forma de racimos de uva.	Colonias blancas sin hemólisis.	Colonias blancas.
<i>St. epidermidis</i> ATCC 12228	+	+/ sin hemólisis	+

Fuente Primaria. (+): Presencia.

Interpretación:

- LA tinción de gram reveló la presencia de cocos gram (+) en forma de racimos de uvas, de color moradas característica de nuestra cepa de trabajo.
- Agar Sangre de Carnero: presencia de colonias blancas con crecimiento homogéneo sin hemólisis.
- Agar Manitol: crecimiento de colonias blancas homogéneas.



Al finalizar los ensayos de Potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo, se efectuó el aislamiento del microorganismo localizado en los medios (Agar) de las placas usadas para los ensayos, comprobando de esta manera la ausencia de microorganismo contaminante. Excepto la placa que se contaminó. VER ANEXO No. 14.

TABLA No.2 Ensayos de Potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el Microorganismo para las dos repeticiones.

Organismo de prueba.	Tinción de gram	Agar Sangre Carnero	Agar Manitol
<i>St. epidermidis</i> ATCC 12228	Colonias moradas en forma de racimos de uva.	Colonias blancas sin hemólisis.	Colonias blancas.
<i>St. epidermidis</i> ATCC 12228	+	+/- sin hemólisis	+

Fuente Primaria. (+): Presencia.

Interpretación:

La tinción de gram reveló la presencia de cocos gram (+) en forma de racimos de uvas, de color moradas característicos de nuestra cepa de trabajo.

Agar Sangre de Carnero: presencia de colonias blancas con crecimiento homogéneo sin hemólisis.

Agar Manitol: crecimiento de colonias blancas homogéneas.



Los ensayos de Potencia de Gentamicina esterilizando todo el material volumétrico y esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el Microorganismo, cumplieron los criterios de aceptación del diseño experimental ANOVA.

TABLA No.3 Resultados del ensayo de Potencia de Gentamicina esterilizando todo el material volumétrico. **Muestra #1:**

ANALISIS DE LA VARIANZA					
Fte. Variación	Gl	SC	CM	F	P
Preparaciones	1	1,1408	1,1408	4,6700	>0.05
Regresión	1	162,0000	162,0000	663,1484	<0.01
Desv. Paralel.	1	0,1250	0,1250	0,5117	>0.05
Curv. Comb.	1	0,0150	0,0150	0,0614	>0.05
Curv. Opuesta	1	0,0067	0,0067	0,0273	>0.05
Tratamientos	5	163,2875			
Bloques	7	15,6592	2,2370	9,1573	<0.05
Totales	47	187,2525			
Error*	34	8,3058	0,2443		

Fuente Primaria.

TABLA No.4 Resultados del ensayo de Potencia de Gentamicina esterilizando todo el material volumétrico. **Muestra #2:**

ANALISIS DE LA VARIANZA					
Fte. Variación	Gl	SC	CM	F	P
Preparaciones	1	5,4675	5,4675	7,4450	>0.05
Regresión	1	168,3613	168,3613	229,2540	<0.01
Desv. Paralel.	1	1,3613	1,3613	1,8536	>0.05
Curv. Comb.	1	0,3037	0,3037	0,4136	>0.05
Curv. Opuesta	1	0,1837	0,1837	0,2502	>0.05
Tratamientos	5	175,6775			
Bloques	7	4,3658	0,6237	0,8493	<0.05
Totales	47	205,0125			
Error*	34	24,9692	0,7344		

Fuente Primaria.



TABLA No.5 Resultados del ensayo de Potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo. **Muestra #3:**

ANALISIS DE LA VARIANZA					
Fte. Variación	gl	SC	CM	F	P
Preparaciones	1	1,6875	1,6875	5,7413	>0.05
Regresión	1	182,4050	182,4050	620,5907	<0.01
Desv. Paralel.	1	0,0800	0,0800	0,2722	>0.05
Curv. Comb.	1	0,5704	0,5704	1,9407	>0.05
Curv. Opuesta	1	0,0337	0,0337	0,1148	>0.05
Tratamientos	5	184,7767			
Bloques	7	4,2292	0,6042	2,0555	<0.05
Totales	47	198,9992			
Error*	34	9,9933	0,2939		

Fuente Primaria.

TABLA No.6 Resultados del ensayo de Potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo. **Muestra #4:**

ANALISIS DE LA VARIANZA					
Fte. variación	gl	SC	CM	F	P
Preparaciones	1	6,0919	6,0919	14,8576	>0.05
Regresión	1	147,9200	147,9200	360,7643	<0.01
Desv. Paralel.	1	0,2450	0,2450	0,5975	>0.05
Curv. Comb.	1	0,0004	0,0004	0,0010	>0.05
Curv. Opuesta	1	1,0837	1,0837	2,6432	>0.05
Tratamientos	5	155,3410			
Bloques	7	14,6531	2,0933	5,1054	<0.05
Totales	47	183,9348			
Error*	34	13,9406	0,4100		

Fuente Primaria.



Se realizaron dos repeticiones para el ensayo de potencia: los ensayos con la variante de la esterilización de la cristalería y los ensayos sin la variante de la esterilización de la cristalería, obteniéndose los siguientes resultados:

Ensayo de Potencia de Gentamicina con material volumétrico esterilizado.

ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA

ANTIBIOTICO: Gentamicina sulfato.

Microorganismo de ensayo: ST. Epidermidis, ATCC: 12228.

Agregar: 0.03ml de microorganismo / 100 ml medio de cultivo. % T: 25.

Medio de cultivo base: 12 ml. Medio de cultivo siembra: 5ml.

Estándar de referencia: Gentamicina sulfato. Vencimiento: 24/02/09.

Procedencia: USA, Potencia: 680 mcg / mg ó UI / mg, lote: j-1.

mg pesado: 10, Venc.: 24/02/09.

Fecha de pesado: 26/01/09 Solv. Inicial: buffer # 3.

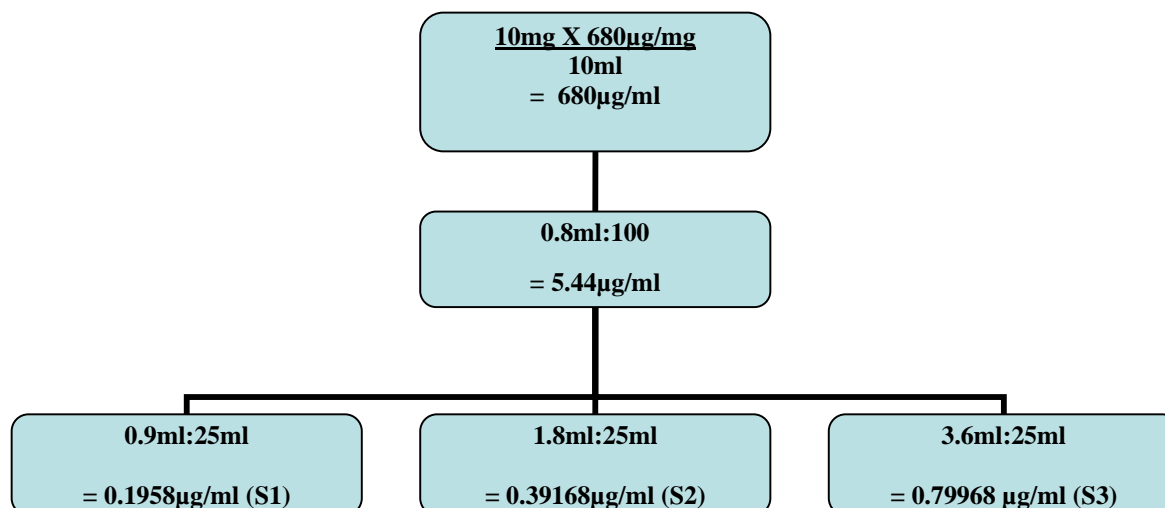
Fecha de ensayo: 02/02/09 Solv. Final: buffer# 3.

Analista: 1.

Inoculo práctico: 0.6ml susp. Microb. / 100 ml medio de cultivo. 52.3%T.

CALCULOS: Estándar de referencia.

Solución madre:



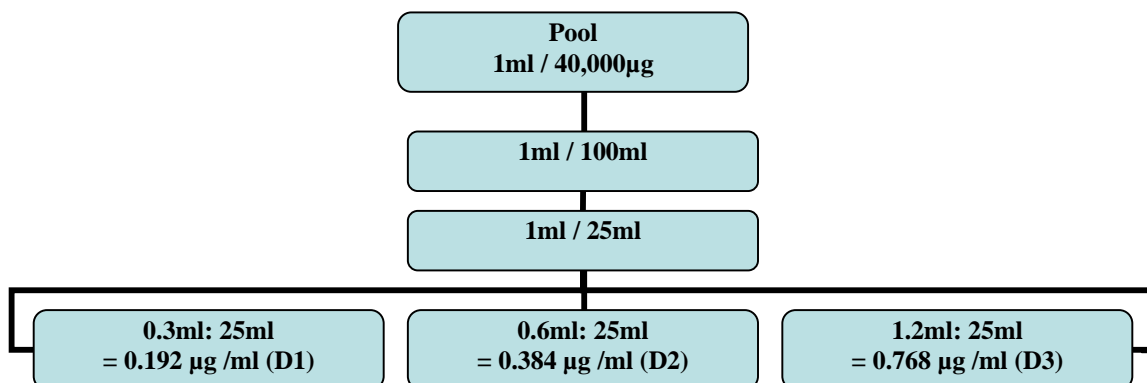


ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA

MUESTRA #: 1

NOMBRE GENERICO: Gentamicina Sulfato.
NOMBRE COMERCIAL: Gentamina Inyectable.
LAB. / PROCEDENCIA: UNIPHARM Guatemala C.A.
FECHA FAB. : 09/08 FECHA VENC. : 09/011.
LOTE: NHR FECHA DE ANALISIS: 02/02/09.
ANALISTA: 1. FECHA DE LECTURA: 03/02/09.

CALCULOS:





POTENCIA DE CILINDRO-PLACA: GENTAMICINA

ESTANDAR : Primario U.S.P. Gentamicina Sulfato P: 680 ug/mg L: J-1 V: 30 días (24/2/09)

MUESTRA : # 1 Gentamina (Gentamicina Sulf. 80 mg/2 ml) Sol. inyectable

Laboratorio: UNIPHARM, Guatemala L: NHR F. Fab.: 9/08 V: 9/2011

ANALISTA : # 1

FECHA DE CALCULO: 27/01/09

FECHA DE ANALISIS:

FECHA DE REVISION:

REVISADO POR:

<<PATRON>> CONCENTRACIONES ug/ml			<< MUESTRA >> CONCENTRACION ug/ml			TOTALES
0,18	0,39	0,80	0,18	0,38	0,78	
16,20	18,80	20,20	16,80	18,60	20,60	111,2
16,60	19,20	21,00	17,00	18,80	22,00	114,6
17,40	19,80	21,60	17,60	20,40	22,00	118,8
17,40	20,20	22,20	18,00	20,20	22,40	120,4
16,60	18,60	22,40	17,60	19,60	21,40	116,2
16,00	19,80	22,60	18,40	20,00	22,00	118,8
19,00	20,00	22,40	17,80	20,60	23,20	123
17,60	18,80	21,40	17,20	19,20	21,80	116
136,80	155,20	173,80	140,40	157,40	175,40	939

Ingrese el número de preparaciones..... 2
 Ingrese el número de dosis de cada preparación..... 3
 Ingrese el número de placas..... 8
 Ingrese el valor de la Potencia Supuesta..... 40,80 mg/ml
 Ingrese el valor de t par 34 grados de libertad.. 2,03



----- ANALISIS DE LA VARIANZA -----

Fte. variación	gl	SC	CM	F	p
Preparación	1	1,1408	1,1408	4,6700	>0.05
Regresión	1	162,0000	162,0000	663,1484	<0.01
Desv. parale	1	0,1250	0,1250	0,5117	>0.05
Curv. Comb.	1	0,0150	0,0150	0,0614	>0.05
Curv. Opues	1	0,0067	0,0067	0,0273	>0.05
Tratamientos	5	163,2875			
Bloques	7	15,6592	2,2370	9,1573	<0.05
Totales	47	187,2525			
Error*	34	8,3058	0,2443		

----- CALCULO DE LA POTENCIA E INTERVALO DE CONFIANZA -----

I	0,3276
M	0,0449
R	1,1089

POTENCIA CALCULADA.....	45,2	mg/ml
PORCIENTO ENCONTRADO.....	110,78	%
RANGO USP /200: % Pag.		ug/mg
C	1,0063
Ms	0,0876
Mi	0,0027
Rs	1,2235
Ri	1,0063

LIMITE SUPERIOR DE LA POTENCIA..... 49,9 mg/ml

LIMITE INFERIOR DE LA POTENCIA..... 41,1 mg/ml

Tabla F (1,34) : 4,13 (5 %)

7,44 (1 %)

% Superior..... 10,34

% Inferior..... 9,25



**ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA**

ANTIBIOTICO: Gentamicina sulfato.

Microorganismo de ensayo: ST. Epidermidis ATCC: 12228.

Agregar: 0.03ml de microorganismo / 100 ml medio de cultivo. % T: 25.

Medio de cultivo base: 12 ml. Medio de cultivo siembra: 5ml.

Estándar de referencia: Gentamicina sulfato. Vencimiento: 24/02/09.

Procedencia: USA, Potencia: 680 mcg / mg ó UI / mg, lote: j-1.

mg pesado: 10, Venc.: 24/02/09.

Fecha de pesado: 26/01/09 Solv. Inicial: buffer # 3.

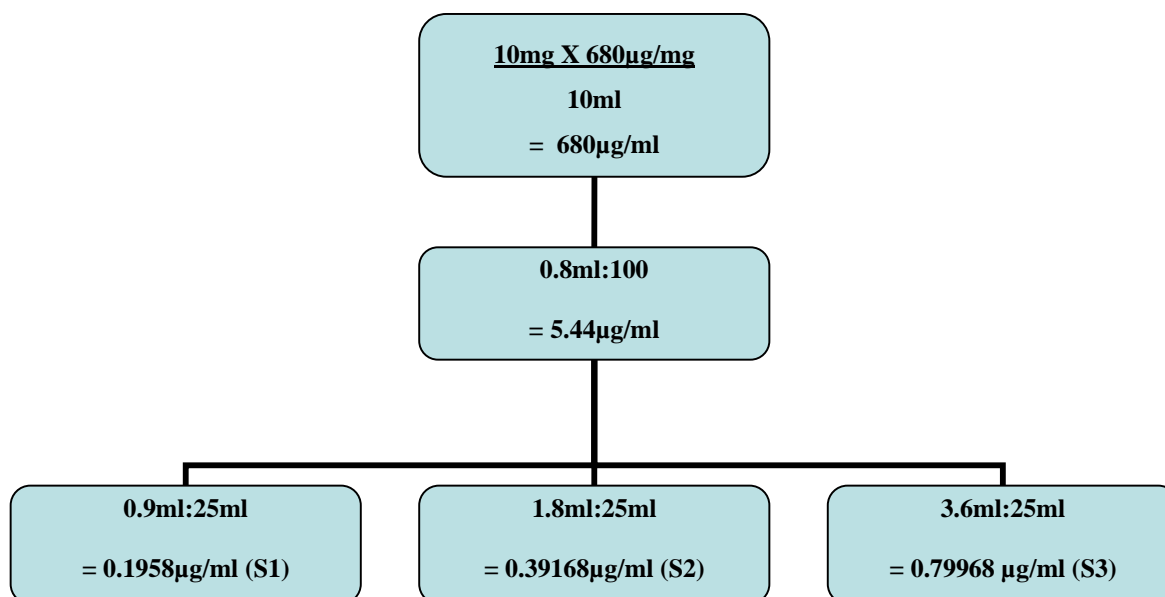
Fecha de ensayo: 02/02/09 Solv. Final: buffer# 3.

Analista: 2.

Inoculo práctico: 1ml susp. Microb. / 100 ml medio de cultivo. 81%T.

CALCULOS: Estándar de referencia.

Solución madre:



ENSAYO DE ANTIBIOTICO

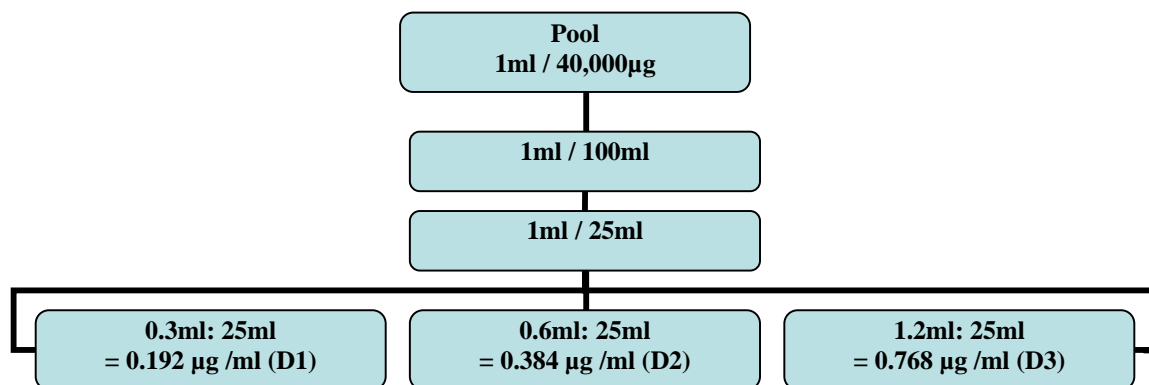


METODO: CILINDRO-PLACA

MUESTRA #: 2

NOMBRE GENERICO: Gentamicina Sulfato.
NOMBRE COMERCIAL: Gentamina Inyectable.
LAB. / PROCEDENCIA: UNIPHARM Guatemala C.A.
FECHA FAB. : 09/08 FECHA VENC. : 09/011.
LOTE: NHR FECHA DE ANALISIS: 02/02/09.
ANALISTA: 2. FECHA DE LECTURA: 03/02/09

CALCULOS:





POTENCIA DE CILINDRO-PLACA: GENTAMICINA

ESTANDAR : Primario Gentamicina Sulfato L: J-1 Proc.: U.S.A Pot: 680 ug/mg V: 23/10/08, 30 días

MUESTRA : # 2 Gentamina (Gentamicina Sulfato 80 mg/2 ml Sol. Iny.)

Lab./Procedencia: Unipharm. L: NHR. F.F: 9/08, F.V: 9/2011.

ANALISTA : # 2

FECHA DE CALCULO: POR:

FECHA DE ANALISIS:

FECHA DE REVISION:

REVISADO POR:

<<PATRON>> CONCENTRACIONES ug/ml			<< MUESTRA >> CONCENTRACION ug/ml			TOTALES
0,20	0,39	0,78	0,20	0,38	0,78	
10,20	16,60	18,80	16,00	17,80	19,60	99
14,00	17,20	19,00	15,20	17,20	19,80	102,4
14,20	16,40	19,00	15,00	17,80	19,40	101,8
14,60	16,80	19,60	15,20	17,80	19,60	103,6
14,20	16,80	19,00	15,60	17,60	20,20	103,4
14,80	17,40	19,00	16,20	17,80	19,80	105
16,00	16,80	20,00	15,00	17,20	18,80	103,8
15,80	18,20	19,40	15,00	17,00	19,40	104,8
113,80	136,20	153,80	123,20	140,20	156,60	823,8

Ingrese el número de preparaciones..... 2
 Ingrese el número de dosis de cada preparación..... 3
 Ingrese el número de placas..... 8
 Ingrese el valor de la Potencia Supuesta..... 41,14 mg/ml
 Ingrese el valor de t par 34 grados de libertad.. 2,03



----- ANALISIS DE LA VARIANZA -----

Fte. variación	gl	SC	CM	F	p
Preparaciones	1	5,4675	5,4675	7,4450	>0.05
Regresión	1	168,3613	168,3613	229,2540	<0.01
Desv. paralela	1	1,3613	1,3613	1,8536	>0.05
Curv. Comb.	1	0,3037	0,3037	0,4136	>0.05
Curv. Opuestas	1	0,1837	0,1837	0,2502	>0.05
Tratamientos	5	175,6775			
Bloques	7	4,3658	0,6237	0,8493	<0.05
Totales	47	205,0125			
Error*	34	24,9692	0,7344		

----- CALCULO DE LA POTENCIA E INTERVALO DE CONFIANZA -----

I	0,3010
M	0,0886
R	1,2263

POTENCIA CALCULADA.....	50,5	mg/ml
PORCIENTO ENCONTRADO.....	122,75	%
RANGO USP 29/2006: 90-125 %	Pag. 1,144	ug/mg
C	1,0183
Ms	0,1578
Mi	0,0226
Rs	1,4382
Ri	1,0534

LIMITE SUPERIOR DE LA POTENCIA..... 59,2 mg/ml

LIMITE INFERIOR DE LA POTENCIA..... 43,3 mg/ml

Tabla F (1,34) : 4,13 (5 %)
7,44 (1 %)

% Superior.....	17,28
% Inferior.....	14,09

Potencia de Gentamicina esterilizando el material volumétrico que entra en contacto con el M.O.



ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA

ANTIBIOTICO: Gentamicina sulfato.

Microorganismo de ensayo: ST. Epidermidis ATCC: 12228.

Agregar: 0.03ml de microorganismo / 100 ml medio de cultivo. % T: 25.

Medio de cultivo base: 12ml. Medio de cultivo siembra: 5ml.

Estándar de referencia: Gentamicina sulfato. Vencimiento: 24/02/09.

Procedencia: USA, Potencia: 680 mcg / mg ó UI / mg, lote: j-1.
mg pesado: 10.

Fecha de pesado: 26/01/09 Solv. Inicial: buffer # 3

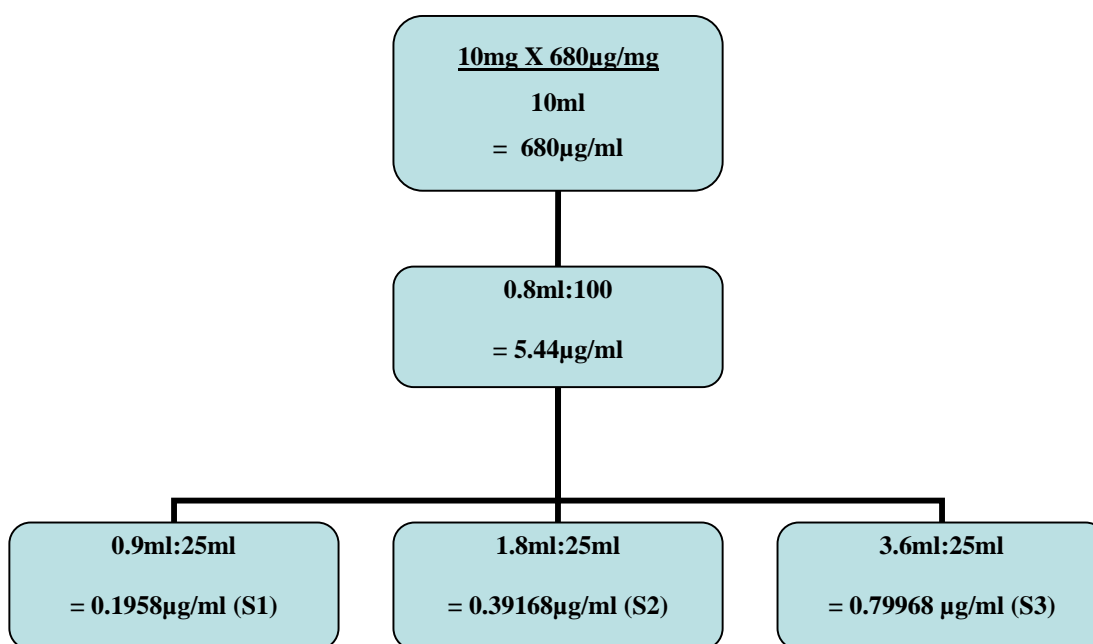
Fecha de ensayo: 02/02/09 Solv. Final: buffer# 3

Analista: 1.

Inoculo práctico: 0.8 ml susp. Microb. / 100 ml medio de cultivo. 69.3%T.

CALCULOS: Estándar de referencia.

Solución madre:



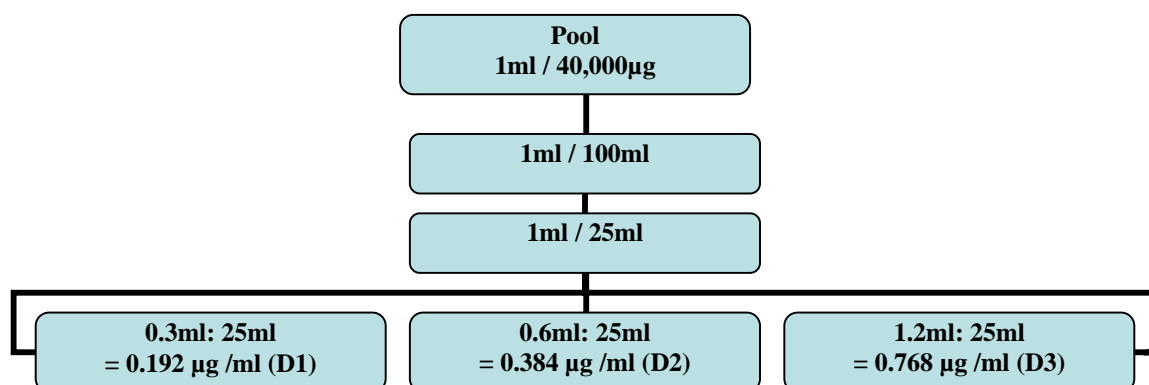
ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA



MUESTRA #: 3

NOMBRE GENERICO: Gentamicina Sulfato
NOMBRE COMERCIAL: Gentamina Inyectable
LAB. / PROCEDENCIA: UNIPHARM Guatemala C.A.
FECHA FAB. : 09/08 FECHA VENC. : 09/011
LOTE: NHR FECHA DE ANALISIS: 02/02/09
ANALISTA: 1 FECHA DE LECTURA: 03/02/09

CALCULOS:





POTENCIA DE CILINDRO-PLACA: Gentamicina

ESTANDAR : Primario U.S.P, Gentamicina Sulfato P: 680 ug/mg V: 30 días (24/2/09)

MUESTRA : #3 Gentamina (Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2 ml) Sol. Inyectable

Fabricante: Unipharm, Guatemala. Lote: NHR F. F: 9/08, V: 9/2011.

ANALISTA :# 1

FECHA DE CALCULO: 4/2/09

FECHA DE ANALISIS: 2/2/09

FECHA DE REVISION:

REVISADO POR:

<<PATRON>>			<< MUESTRA >>			
CONCENTRACIONES ug/ml			CONCENTRACION ug/ml			
0,20	0,39	0,78	0,19	0,38	0,77	TOTALES
14,10	17,50	18,80	14,60	17,60	19,50	102,1
14,60	16,90	19,10	15,90	17,10	20,10	103,7
14,90	18,50	19,80	14,60	19,00	20,40	107,2
14,20	18,60	19,40	14,50	18,00	20,00	104,7
15,90	16,60	19,50	15,20	17,10	19,80	104,1
14,70	16,10	19,20	15,10	16,90	19,30	101,3
14,80	17,50	19,80	15,20	18,00	20,20	105,5
14,40	16,90	19,40	15,00	17,30	19,80	102,8
117,60	138,60	155,00	120,10	141,00	159,10	831,4

Ingrese el número de preparaciones..... 2
 Ingrese el número de dosis de cada preparación..... 3
 Ingrese el número de placas..... 8
 Ingrese el valor de la Potencia Supuesta..... 40,80 mg/ml
 Ingrese el valor de t par 34 grados de libertad.. 2,03



ANALISIS DE LA VARIANZA

Fte. variación	gl	SC	CM	F	p
Preparacione	1	1,6875	1,6875	5,7413	>0.05
Regresión	1	182,4050	182,4050	620,5907	<0.01
Desv. paralel	1	0,0800	0,0800	0,2722	>0.05
Curv. Comb.	1	0,5704	0,5704	1,9407	>0.05
Curv. Opuest	1	0,0337	0,0337	0,1148	>0.05
Tratamientos	5	184,7767			
Bloques	7	4,2292	0,6042	2,0555	<0.05
Totales	47	198,9992			
Error*	34	9,9933	0,2939		

CALCULO DE LA POTENCIA E INTERVALO DE CONFIANZA

I	0,3011
M	0,0473
R	1,1151

POTENCIA CALCULADA.....	45,5	mg/ml
PORCIENTO ENCONTRADO.....	111,51	%
RANGO USP /200: % Pag.		ug/mg
C	1,0067
Ms	0,0880
Mi	0,0072
Rs	1,2246
Ri	1,0168

LIMITE SUPERIOR DE LA POTENCIA..... 50,0 mg/ml

LIMITE INFERIOR DE LA POTENCIA..... 41,5 mg/ml

Tabla F (1,34) : 4,13 (5 %)
7,44 (1 %)

% Superior.....	9,83
% Inferior.....	8,81



ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA

ANTIBIOTICO: Gentamicina sulfato.

Microorganismo de ensayo: ST. Epidermidis ATCC: 12228.

Agregar: 0.03ml de microorganismo / 100 ml medio de cultivo. % T: 25

Medio de cultivo base: 12 ml. Medio de cultivo siembra: 5ml.

Estándar de referencia: Gentamicina sulfato. Vencimiento: 24/02/09

Procedencia: USA, Potencia: 680 mcg / mg ó UI / mg, lote: j-1.
mg pesado: 10.

Fecha de pesado: 26/01/09 Solv. Inicial: buffer # 3.

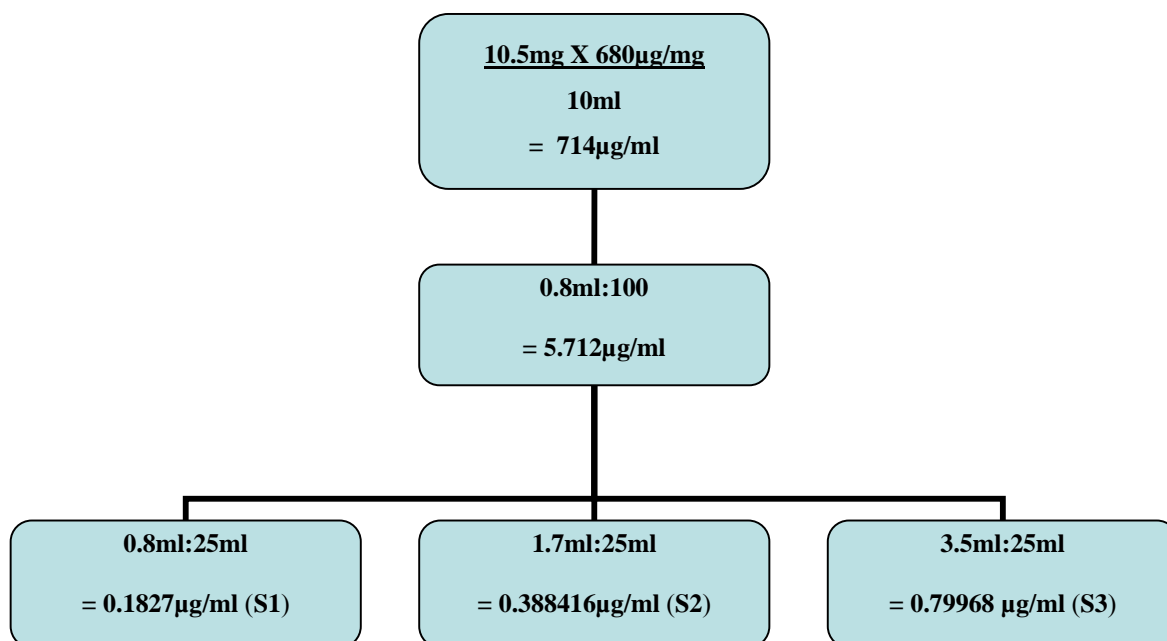
Fecha de ensayo: 02/02/09 Solv. Final: buffer# 3.

Analista: 2.

Inoculo práctico: 0.9ml susp. Microb. / 100 ml medio de cultivo. 82.3%T.

CALCULOS: Estándar de referencia.

Solución madre:



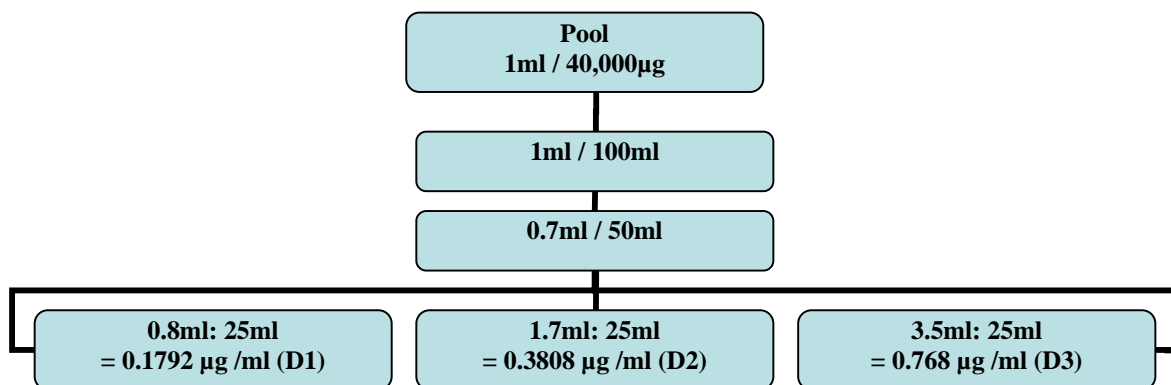


ENSAYO DE ANTIBIOTICO
METODO: CILINDRO-PLACA

MUESTRA #: 4

NOMBRE GENERICO: Gentamicina Sulfato.
NOMBRE COMERCIAL: Gentamina Inyectable.
LAB. / PROCEDENCIA: UNIPHARM Guatemala C.A.
FECHA FAB. : 09/08 FECHA VENC. : 09/011.
LOTE: NHR FECHA DE ANALISIS: 02/02/09.
ANALISTA: 2 FECHA DE LECTURA: 03/02/09.

CALCULOS:





POTENCIA DE CILINDRO-PLACA: Gentamicina

ESTANDAR : Primario U.S.P, Gentamicina Sulfato P: 680 ug/mg V: 30 dias (24/2/09)

MUESTRA : # 4 Gentamina (Gentamicina Sulfato 80 mg/ 2 ml) Sol. Inyectable

Fabricante: Unipharm, Guatemala. Lote: NHR F. F: 9/08, V: 9/2011.

ANALISTA :# 2.

FECHA DE CALCULO: 03/02/09 POR: F. Lo

FECHA DE ANALISIS: 27/1/09

FECHA DE REVISION:

REVISADO POR:

<<PATRON>> CONCENTRACIONES ug/ml			<< MUESTRA >> CONCENTRACION ug/ml			TOTALES
0,20	0,39	0,78	0,19	0,38	0,77	
13,00	15,90	17,10	14,30	15,60	18,00	93,9
13,70	15,80	16,80	13,80	16,20	18,80	95,1
13,20	15,50	16,90	13,70	15,70	18,50	93,5
15,10	16,90	18,80	14,90	16,30	22,10	104,1
13,90	15,40	17,90	14,00	16,60	18,20	96
12,80	15,10	17,50	14,20	16,00	17,60	93,2
12,60	16,90	17,50	14,60	15,70	17,80	95,1
13,00	14,90	17,80	13,80	16,60	18,10	94,2
107,30	126,40	140,30	113,30	128,70	149,10	765,1

Ingrese el número de preparaciones..... 2
 Ingrese el número de dosis de cada preparación..... 3
 Ingrese el número de placas..... 8
 Ingrese el valor de la Potencia Supuesta..... 40,80 mg/ml
 Ingrese el valor de t par 34 grados de libertad.. 2,03



ANALISIS DE LA VARIANZA

Fte. variación	gl	SC	CM	F	p
Preparaciones	1	6,0919	6,0919	14,8576	>0.05
Regresión	1	147,9200	147,9200	360,7643	<0.01
Desv. paralela	1	0,2450	0,2450	0,5975	>0.05
Curv. Comb.	1	0,0004	0,0004	0,0010	>0.05
Curv. Opuestas	1	1,0837	1,0837	2,6432	>0.05
Tratamientos	5	155,3410			
Bloques	7	14,6531	2,0933	5,1054	<0.05
Totales	47	183,9348			
Error*	34	13,9406	0,4100		

CALCULO DE LA POTENCIA E INTERVALO DE CONFIANZA

I	0,3011
M	0,0998
R	1,2583

POTENCIA CALCULADA.....	51,3	mg/ml
PORCIENTO ENCONTRADO.....	125,73	%
RANGO USP /200: % Pag.		ug/mg
C	1,0116
Ms	0,1549
Mi	0,0470
Rs	1,4285
Ri	1,1143

LIMITE SUPERIOR DE LA POTENCIA..... 58,3 mg/ml

LIMITE INFERIOR DE LA POTENCIA..... 45,5 mg/ml

Tabla F (1,34) : 4,13 (5 %)
7,44 (1 %)

% Superior.....	13,53
% Inferior.....	11,45



Comparación de ambos métodos de ensayos de potencia de Gentamicina Sulfato por el método Cilindro-Placa esterilizando todo el material volumétrico y esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo de prueba.

TABLA No.8 Porcentaje encontrados y el análisis estadístico de los ensayos de Potencia de Gentamicina.

Analistas	Ensayo de Potencia de Gentamicina con material volumétrico esterilizado.	Ensayo de potencia de Gentamicina esterilizando el material volumétrico que esta en contacto con el Microorganismo.
ANALISTA 1	110.78 %	111.51%
ANALISTA 2	122.75 %	125.73 %
PROMEDIO	116.77	118.62
D.E. (< 5%)	1,30814755	
Coefficiente de Variación	1,12027708	

Fuente Primaria.



Con respecto a la calibración de 2 balones de 25ml, 1 balón sometido a esterilización y 1 balón no sometido a esterilización. Se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA No.9 Resultados de la Calibración de balón aforado de 25ml no sometido a esterilización.

Calibración de un balón de 25 ml(MINSA) No Esterilizado						
Volumen	25ml	±0.6ML	Ident:5641	Pirex	Clase A	No esterilizado
D.aire	0.00118	D.liquido	0.997044	D.pesas	0.9	
T °C	Masa Inicial	Masa Final	Masa Contenida Aparente	Masa contenida al vacío	Volumen Contenido ml	
25	24,5947	49,5107	24,916	24,9128204	24,98668103	
25	24,5947	49,4975	24,9028	24,8996221	24,97344359	
25	24,5947	49,4961	24,9014	24,8982223	24,97203961	
25	24,5947	49,5175	24,9228	24,9196195	24,99350032	
25	24,5947	49,5273	24,9326	24,9294183	25,00332812	
25	24,5947	49,5244	24,9297	24,9265187	25,0004199	
25	24,5947	49,5002	24,9055	24,9023217	24,97615125	
				Promedio	24,98650912	
				Desviacion Estandar	0,012991377	Limite Intervalo Confianza
				C.V.	0,051993566	0,6ml>0,00962397ml
				Intervalo Confianza	0,00962397	

Fuente Primaria.



TABLA No.10 Resultados de la Calibración de balón aforado de 25ml sometido a esterilización.

Calibración de un balón de 25 ml(MINSA)Esterilizado						
Volumen	25ml	±0.6ML	Ident:N.D.	Assisten	Clase: N.D.	Esterilizado
D.aire	0.00118	D.liquido	0.997044	D.pesas	0.9	
T °C	Masa Inicial	Masa Final	Masa Contendida Aparente	Masa contenida al vacio	Volumen Contenido ml	
25	22,5487	47,5747	25,026	25,0228064	25,09699308	
25	22,5487	47,4681	24,9194	24,91622	24,99009068	
25	22,5487	47,4638	24,9151	24,9119205	24,98577848	
25	22,5487	47,4431	24,8944	24,8912232	24,96501976	
25	22,5487	47,4647	24,916	24,9128204	24,98668103	
25	22,5487	47,4615	24,9128	24,9096208	24,98347195	
25	22,5487	47,4481	24,8994	24,8962225	24,97003394	
				Promedio	24,99686699	Limite Intervalo Confianza
				Desviacion Estandar	0,04511383	0,6ml> 0,033420179
				C.V.	0,18047794	
				Intervalo Confianza	0,033420179	

Fuente Primaria.



7. ANALISIS DE LOS RESULTADOS



Según el ensayo de potencia de Gentamicina descrito en la USP y la realización de los ensayos, pero con la diferencia de la esterilización solamente del material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo, observamos que no existe ninguna influencia en la variable que se le realizó a estos ensayos; ya que cumplieron con las especificaciones establecidas en la monografía de esta farmacopea.

En relación a los resultados obtenidos:

Encontramos que en las placas con medios de cultivo no hay contaminación debido a que observamos halos claros y de circunferencia bien definidos, y a su alrededor colonias pequeñas de color blanquecino gram positivo confirmando la presencia del microorganismo de prueba *St. epidermidis*.

Obtuvimos la contaminación de 1 placa de las 22 con las que se estaba trabajando, atribuible a la falta de experiencia de los analistas lo que se compenso utilizando placas extras, no afectando ni modificando este resultado a nuestro estudio.

La caracterización del *St. epidermidis* en la prueba de tinción de gram, el aislamiento en agar sangre de carnero y agar manitol antes de iniciar y finalizar cada uno de los ensayos fue para verificar la presencia de esta bacteria así como la ausencia de otras bacterias contaminantes; demostrándose de ésta forma que las características morfológicas básicas de nuestro microorganismo de trabajo (*St. epidermidis*) coincidieron con las descritas por la literatura para estas pruebas, manifestándose que no hubo contaminación de cultivos en el desarrollo de los ensayos.

Al comparar y analizar los resultados obtenidos de los ensayos de potencia de Gentamicina esterilizando solamente el material volumétrico que esta en contacto con el microorganismo y esterilizando todo el material volumétrico nos revelan que no hay presencia de microorganismos contaminantes en ambos métodos y que hay una mínima dispersión en los resultados como lo demostró la Desviación Estándar; se verifica claramente que la dispersión de los resultados entre un analista y otro, es mínima y se encuentran dentro del rango de aceptación permitido de la Desviación Estándar para ensayos Microbiológicos (< 5%).

Con respecto a los criterios de aceptación a ser evaluados y el uso valido de análisis de varianza (ANOVA) como herramienta de inferencia estadística, relacionado con el tratamiento del valor (P): la regresión, desviación del paralelismo, curva opuesta y combinada han demostrado tener valores aceptables para la valides a cada uno de nuestros ensayos.



En la calibración de los balones aforados se demostró que la temperatura es un factor que interviene en el desarrollo del ensayo de potencia de antibióticos, debido a que al someterlos a altas temperaturas las moléculas del vidrio se expanden provocando una variabilidad en el volumen, causando de esta forma un error en las concentraciones de las diluciones de estándar y de la muestra, además de afectar la vida media del producto.



8. CONCLUSION



Después de realizar nuestro trabajo de investigación hemos llegado a las siguientes conclusiones:

Se demuestra que al realizar el ensayo de potencia de Antibióticos esterilizando solamente el material volumétrico que entra en contacto con el microorganismo de prueba, este es viable y reproducible, sin evidencias de posibles contaminaciones en los medios de cultivos usados en el desarrollo del ensayo.

El cambio efectuado en el ensayo no interfiere en el análisis de potencia de gentamicina, ya que cumplen con los rangos de tolerancia del activo y criterios de aceptación del diseño estadístico 3 + 3 que hacen valido este tipo de ensayo.

Al comparar los 2 ensayos; efectuando la variante de la esterilización y no efectuando la variante demostramos que se obtienen resultados similares y aceptables al ser sometidos a los test estadísticos.

Con la calibración de los balones se logro demostrar la influencia de la temperatura sobre el material de vidrio sometido a esterilización causando un error en las medidas de volúmenes y afectando directamente las concentraciones de las soluciones trabajo.



9. RECOMENDACIONES



Para mejorar esta investigación recomendamos lo siguiente:

- Proponemos a futuros investigadores interesados en el tema realizar la validación del ensayo de potencia en el que se esteriliza solamente la cristalería que entra en contacto con el microorganismo por el método cilindro en placa con el objetivo de demostrar la eficacia y tener evidencia irrefutable de que el ensayo es viable.
- Para tener una mejor apreciación de los resultados de las muestras sería conveniente incorporar un tercer analista en los ensayos.
- A todo interesado en el tema, en vista de los nuevos avances científicos y con lo respecta a las nuevas técnicas de caracterización de microorganismos es necesario recurrir a nuevos métodos de identificación por biología molecular.
- Al Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos, tener un mayor control en el sistema de entrada y salida, en los cambios vestimenta para asegurar más el control de polvo, partículas y microorganismos para el control microbiológico.
- Incorporar diferenciales de presión al sistema de aire del departamento de microbiología para reducir el riesgo de contaminaciones microbiológicas en las áreas de trabajo.
- A los Analistas, tener extrema precaución en el desarrollo del ensayo para prevenir contaminaciones de los medios de cultivo. Por otra parte hay que tener una buena manipulación de la técnica para desarrollar el ensayo.



10. BIBLIOGRAFIA



- **Code of federal regulations, Food and Drugs, 21.office of the federal register national archives and records administration 1986. Pag.242,244,251.**
- **Mendenhall William, Estadística Matemática con Aplicaciones 2ed. grupo editorial Iberoamérica. México, 1994.Pág.547-548,557.**
- **Merck. Manual de cultivos. 2ed. 1982.**
- **The United State Pharmacopeia (USP) 30. The National Formulary (NF) 25, 2007. Pag.111-118.**
- **Validación de Métodos Analíticos/Asociación Española de Farmacéutica de Industria (AEFI)/ 2001.Pág.190-206.**
- **"Medidas de dispersión," Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2008 <http://mx.encarta.msn.com> © 1997-2008 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.**
- **Potencia vs. eficacia. universidad de Arizona. <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c2-5-1-1.html>.**
- **Vidrio borosilicato. Instrumentación científico técnica(I, C, T, S.L.) <http://www.ictsl.net/productos/propiedadestecnicas/021b079654102b433/>**



11. ANEXOS

*Cronograma de Actividades*

Actividades	Especificación de Actividades	Periodo 2008-2009
Elaboración de Protocolo	Tema, Objetivos, Antecedentes, Justificación, Marco Teórico	Noviembre 2008
Procedimiento Experimental	Material y Método	Enero 2009
Procesamiento de información de datos	Resultados y Análisis de Resultados	Marzo 2009
Elaboración de Informe Final	Conclusión, Recomendación, Anexos	Marzo 2009
Presentación de Informe Final	Trabajo Investigativo Terminado	Abril 2009



ANEXO No. 1.

Lavado de cristalería nueva

1. Depositar la cristalería nueva en agua caliente por 1 hora.
2. Utilizar guantes de goma y sumergir la cristalería en una solución al 2% de HCL, con una relación de 2ml por cada 3 litros de agua destilada (24-48 horas).
3. Proceder a lavar cristalería con una solución de detergentes con ayuda de hisopos, paste y 3 ciclos de enjuague.
4. Enjuagar con agua de grifo 5 veces.
5. Sumergir y enjuagar cristalería con agua destilada 3 veces.
6. Realizar prueba al agua de lavado, con azul de bromotimol (20ml de muestra de agua mas 4 gotas de azul de bromotimol, para una coloración azul o verdosa se debe de continuar el enjuague y para coloración amarilla realizar secado).
7. Escurrir y secar cristalería en un horno a 100°C x 1 hora.
8. Almacenar en lugar seco y cerrado.



ANEXO No. 2.

Medios de cultivo usados para el ensayo de Potencia de Gentamicina Sulfato.

Medio número 1

Pectona.....	6g
Digerido pancreático de caseína.....	4g
Extracto de levadura.....	3g
Extracto de carne.....	1.5g
Dextrosa.....	1g
Agar.....	15g
Agua c.b.p.....	1000ml
pH después de la esterilización.....	6.6 ± 0.1

Medio número 11

Pectona.....	6g
Digerido pancreático de caseína.....	4g
Extracto de levadura.....	3g
Extracto de carne.....	1.5g
Dextrosa.....	1g
Agar.....	15g
Agua c.b.p.....	1000ml
pH después de la esterilización	8.3±0.1

Agar Sangre de Carnero

Pectona de caseína.....	15g
Pectona de harina de soya.....	5g
Sodio Cloruro; agar -agar.....	15g.
Agua c.b.p.....	1000ml
Para su preparación disolver 40g / l esterilizar al autoclave y verter en placa. pH: 7.3 ± 0.1	

**Agar manitol**

Pectona de carne.....	10g
Extracto de carne.....	1g
Sodio Cloruro.....	75g
(-) – manita.....	10g
Rojo de Fenol.....	0.025g
Agar-Agar.....	12g
Agua c.b.p.....	1000ml

Para su preparación disolver 108g / l esterilizar al autoclave y verter en placa. pH: 7.4 ± 0.1

Caldo BHI

Infusión de cerebro.....	200g
Infusión de corazón.....	250g
Pectona.....	10g
Cloruro de Sodio.....	5g
Glucosa.....	2g
Fosfato disódico.....	2.5g

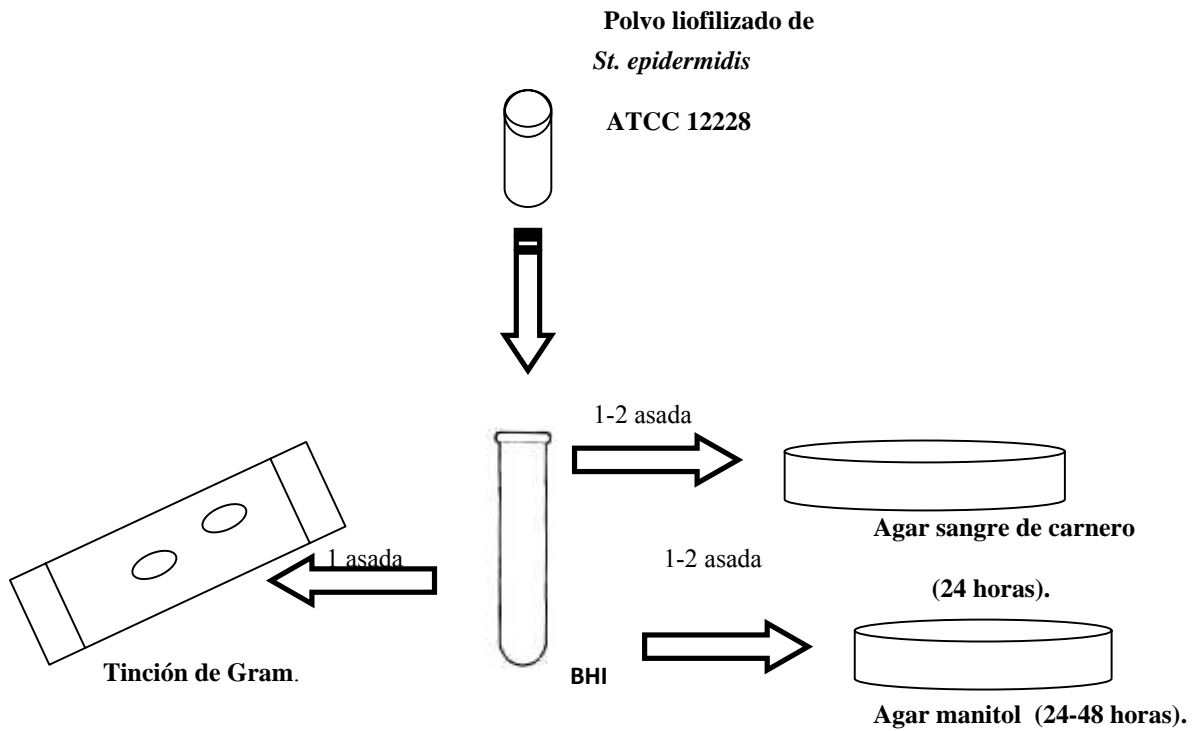
ANEXO No. 3.**Solución Buffer usada para el ensayo de Potencia de Gentamicina Sulfato.**

SOLUCION AMORTIGUADORA No. 3: 0.1M, pH 8- disolver 13.61 g de fosfato monobásico de potasio y 0.523g de fosfato monobásico de potasio en 1000ml de agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico 18N o hidróxido de potasio 10N a 8 ±0.1.



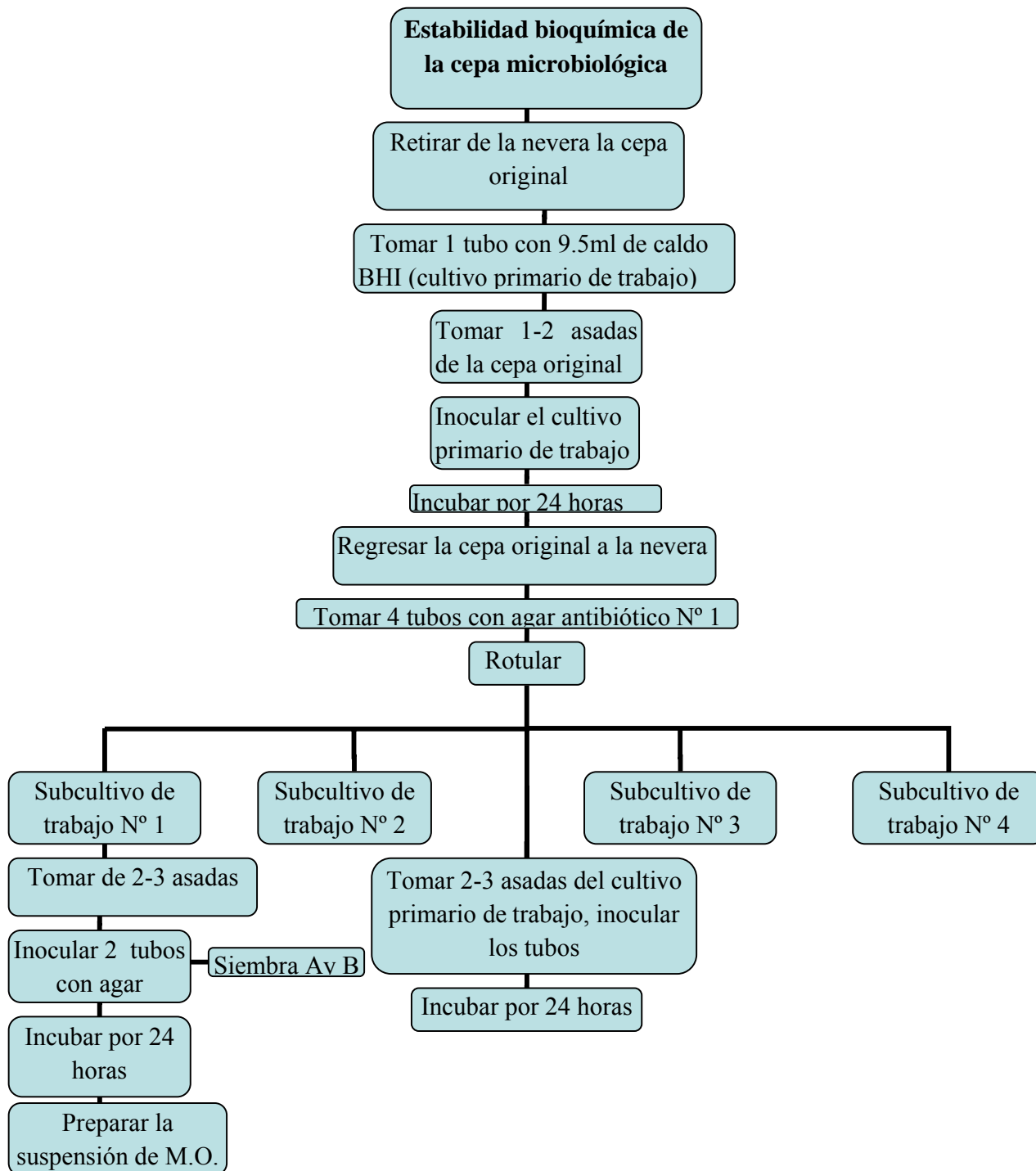
Anexo No. 4.

Ensayo de caracterización de Cepa Trabajo.

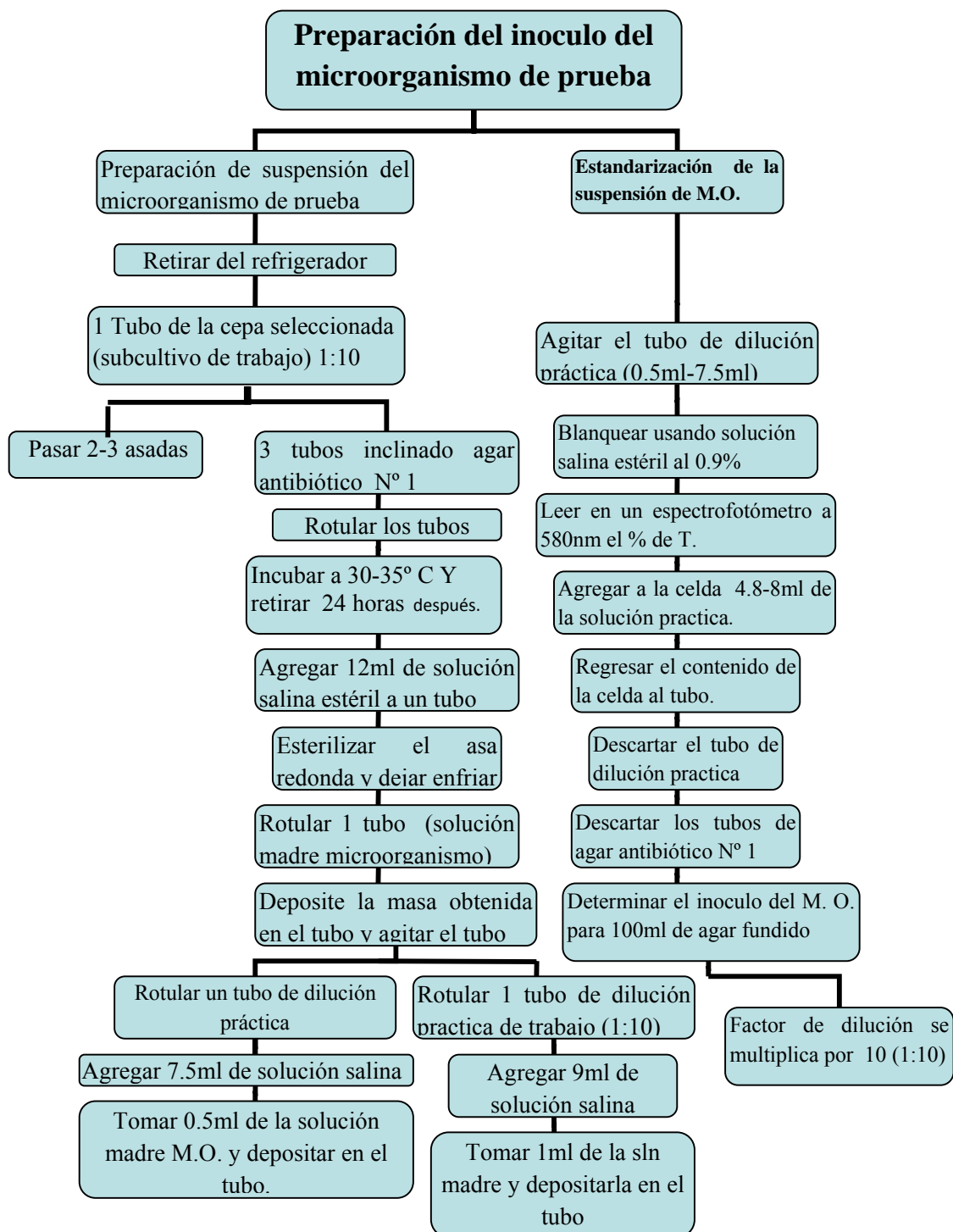




Anexo No. 5.



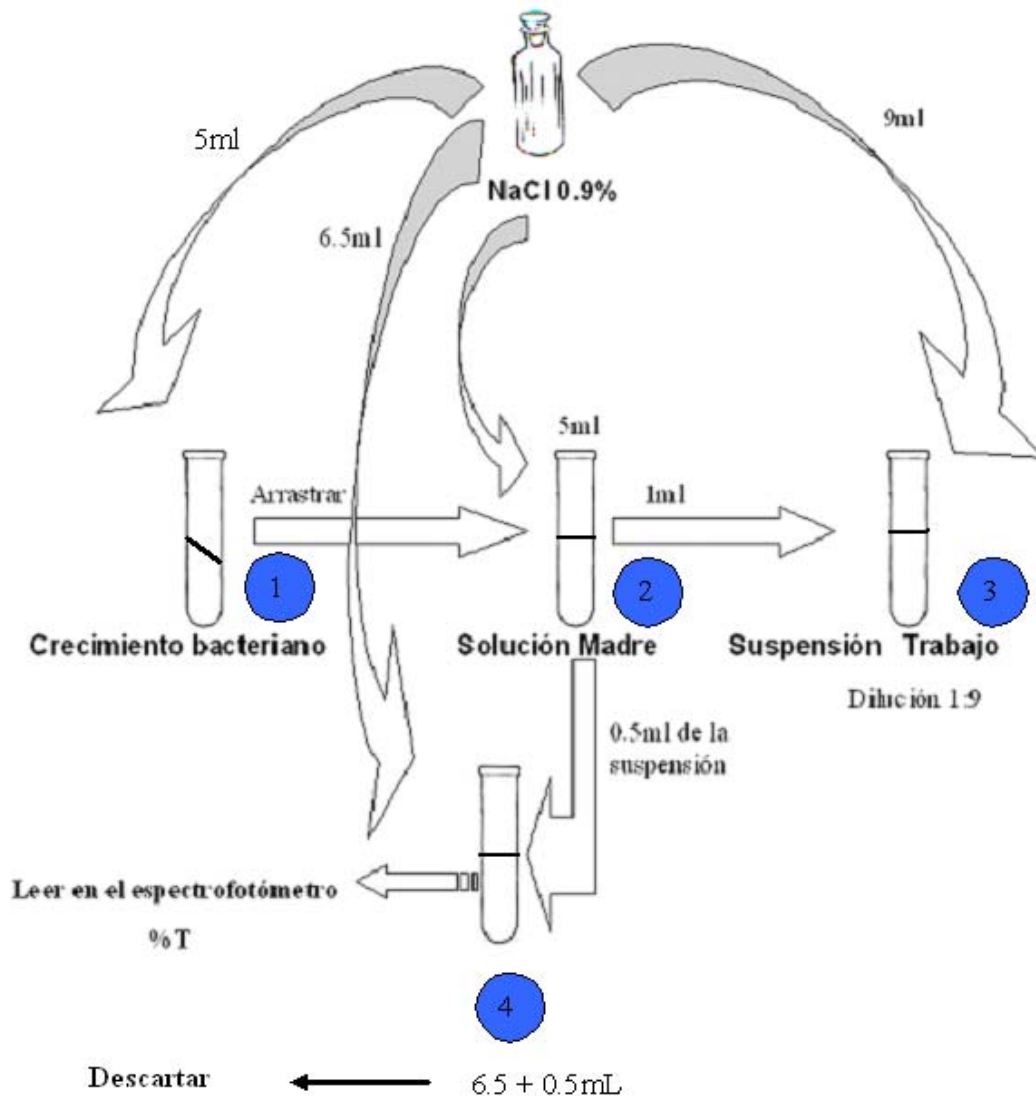
Anexo No. 6.



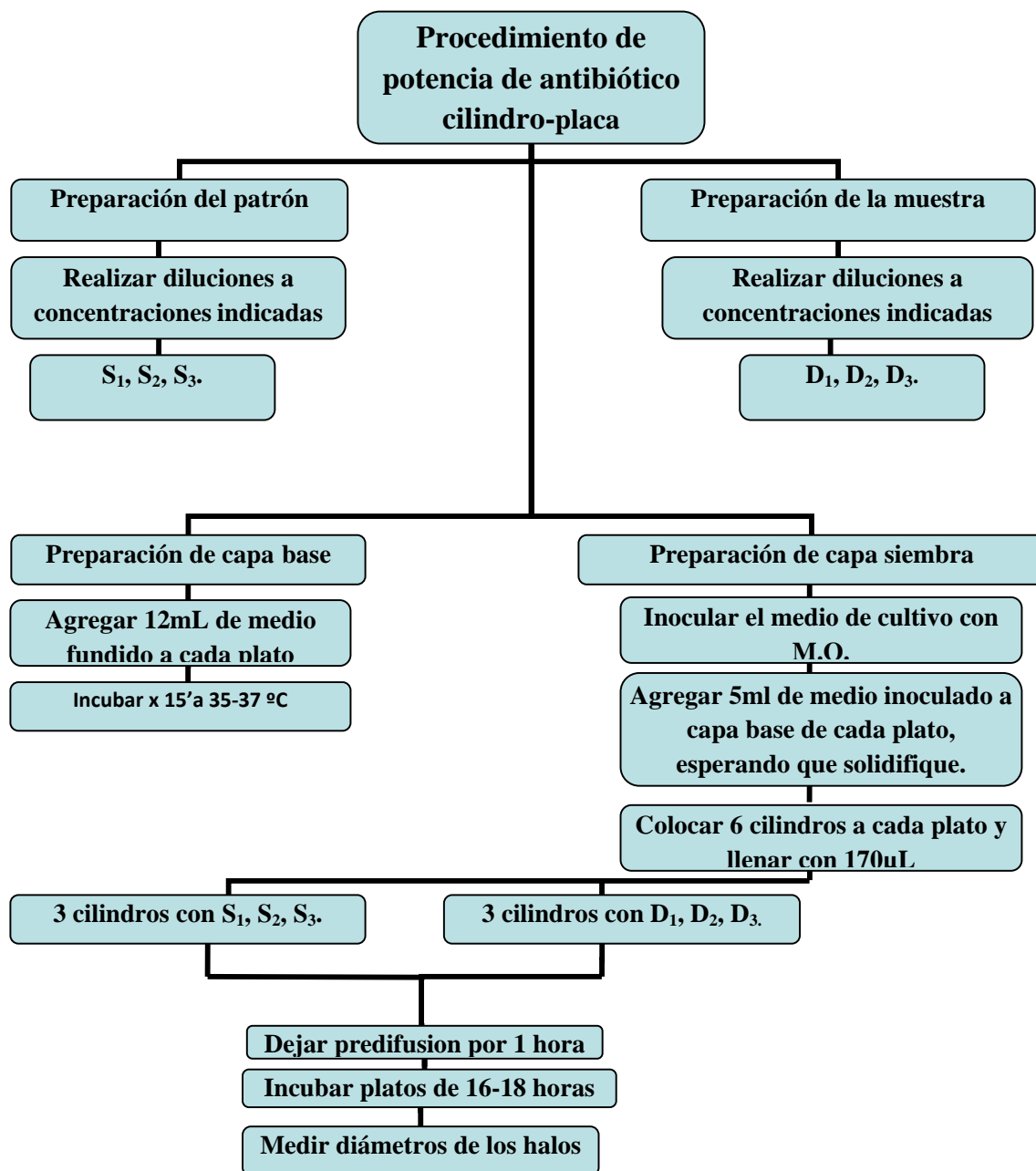


Anexo No. 7.

Preparación de la Suspensión del Microorganismo.



ANEXO No. 8.



Anexo No. 9.



Calibración de Balones Aforados.

- 1) Previamente, el balón aforado se limpia y se enjuaga, después se cuelga en posición invertida vertical hasta que se seque.
- 2) Una vez que el balón está seco, se coloca junto con su tapón en la balanza y se obtiene su masa. Debe tomarse en cuenta que para los balones aforados grandes no se puede utilizar una balanza analítica ordinaria (tomar en consideración la capacidad de la balanza).
- 3) Una vez realizada la operación anterior se procede a llenar el balón hasta su marca de aforo con agua destilada (fuera de la balanza), cuidando que tanto la boca del mismo como su tapón no queden húmedo (para esto es adecuado usar un embudo).
- 4) Después de obtener la primera medida de la masa del balón con el agua, se procede a extraer una pequeña porción del agua que está contenida en el mismo, para lo cual se puede usar una pipeta (fuera de la balanza).
- 5) Luego, la porción de agua retirada se repone tomando como referencia la marca de aforo.
- 6) Se coloca el balón lleno de agua en la balanza y se obtiene su masa.
- 7) Todo el procedimiento anterior se repite seis veces más. En este caso el peso inicial permanecerá constante, registrándose en cada caso la masa obtenida después de reponer el agua retirada.
- 8) Una vez calculado los volúmenes contenidos, determine el valor promedio. La desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza.
- 9) Compare los límites de confianza obtenidos con la tolerancia que da el fabricante para ese equipo.
- 10) **Anexo No. 10.**



Especificaciones del método Cilindro-Placa

Tabla basada en la USP30/ NF25.

Fármaco	Gentamicina
Método	Cilindro-placa
Solvente inicial	Buffer 3
Solvente final	Buffer 3
Tiempo de refrigeración	1 Mes
M.O. de ensayo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> # ATCC 12228
Inoculo Teórico	0.03 ml/ 100 ml medio
Temperatura incubación	36-37.5 °C
Dilución Teórica	1:14ml
Dilución Practica	0.5:6.5ml
Capa Base	12 ml
Capa siembra	5 ml



Anexo No. 11.

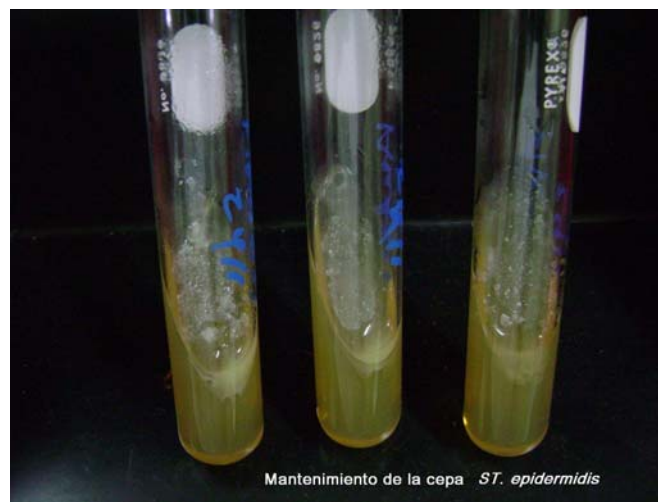
Lavado de cristalería sucia.

1. Descontaminar en autoclave a 121°C (15-18lbs) por 35 minutos.
2. Descartar en una bolsa plástica los desechos o agares.
3. Proceder a lavar cristalería con ayuda de Hisopos, paste y solución de detergente, 3 ciclos hisopados y 3 ciclos de enjuague.
4. Enjuagar cristalería y sumergir en una pana plástica conteniendo 1 solución de jabón desinfectante, agua potable y 10g de detergente (dejarla por 24 horas). Ver bitácora de lavado de cristalería.
5. Después de las 24 horas; proceder a lavar cristalería con ayuda de hisopos, paste y solución de detergente, 3 ciclos hisopados y 3 ciclos de enjuague.
6. Proceder a lavar y enjuagar nuevamente con agua de grifo 5 veces.
7. Sumergir o enjuagar cristalería con agua destilada 3 veces.
8. Realizar prueba con azul de bromotimol al enjuague final (20ml de muestra mas 4 gotas de azul de bromotimol, para una coloración azul o verdosa se debe de continuar el enjuague y para coloración amarilla pH de 6-7.6 realizar secado.)
9. Escurrir y secar cristalería en horno a 100°C / 1hora.
10. Una vez secada la cristalería se procede a clasificar y almacenar en su respectivo estante.



ANEXO No. 12.

Cuñas de agar inclinado conteniendo crecimiento del Microorganismo test.



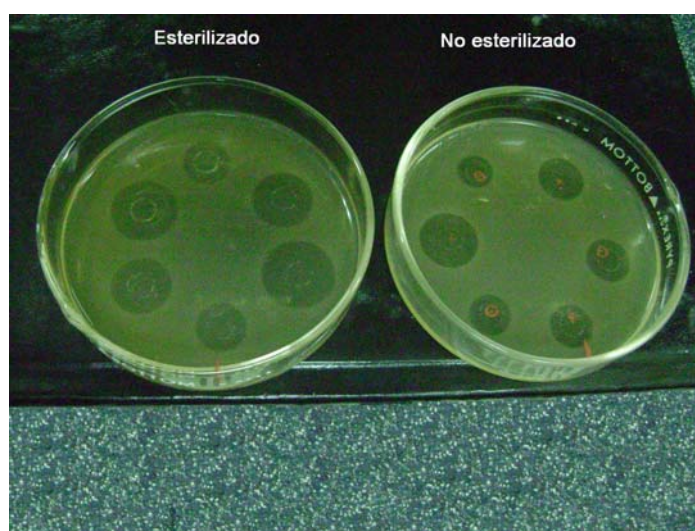
A partir de las cuñas se preparan las suspensiones de microorganismos para los ensayos.



ANEXO No. 13.

Placas de ensayos de potencia de gentamicina (cilindro-placa)

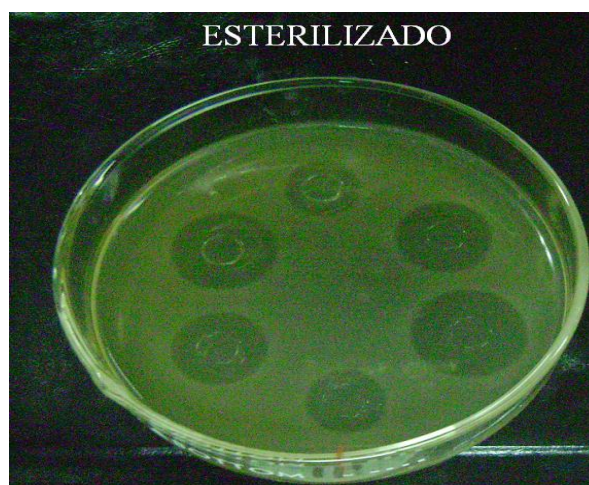
(A)



La imagen evidencia que no hubo contaminación en las placas durante el desarrollo de los ensayos, lo cual demuestra que no presentaban diferencias visibles en la formación y tamaños de los halos.



(B)

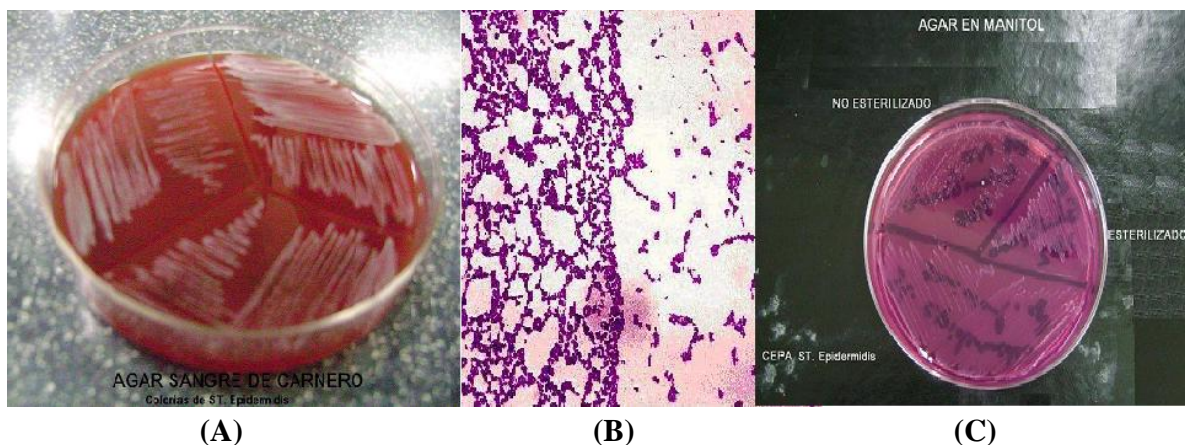


(C)

Las imágenes B y C que se presentan demuestran cada uno de los ensayos utilizando cristalería esterilizada y no esterilizada, esterilizando solamente el material que entra en contacto con el microorganismo de test.



ANEXO No. 14.



Las siguientes imágenes muestran las técnicas de caracterización efectuadas en el ensayo de potencia

(A) La imagen presenta los estriados de la cepa en agar sangre de carnero.

(B) La imagen presenta la tinción de gram de *St. epidermidis*.

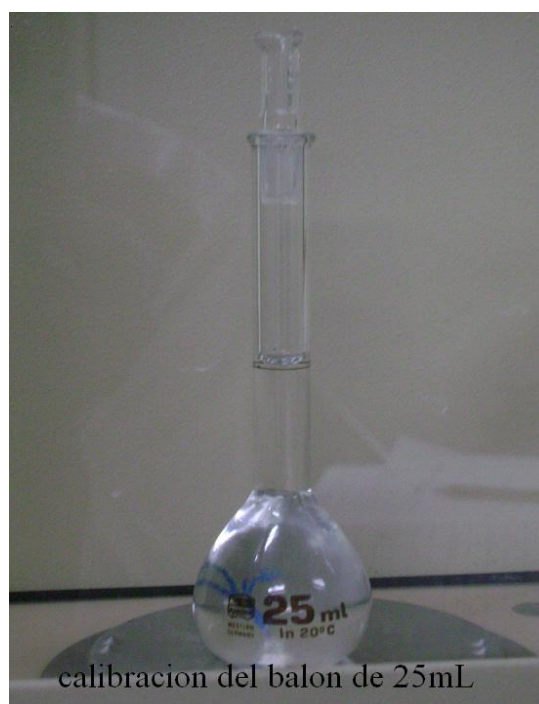
(C) La imagen presenta los estriados de la cepa en agar manitol.

ANEXO No. 15.

(A)



(B)



La imagen (A) balón esterilizado e imagen (B) balón no esterilizado. Estas imágenes demuestra la calibración de la cristalería para conocer el grado de variabilidad que existe cuando es sometido cierto grado de temperatura.



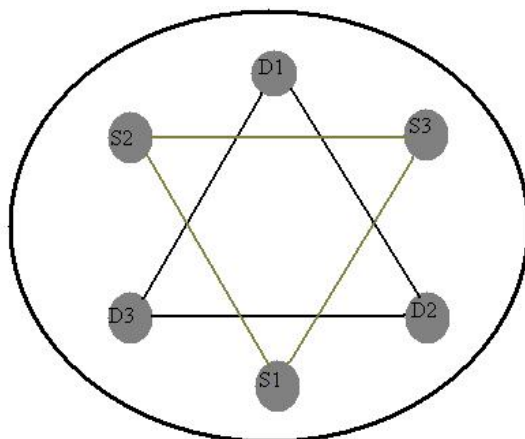
ANEXO No. 16.

Realizar Tinción de Gram.:

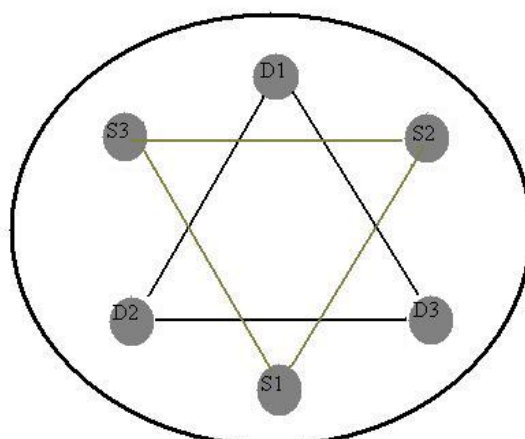
- Agregar 2 gotas de agua destilada a cada lado de la porta objeto.
- Hacer 2 asas en la cepa o siembra o cultivo y adicionar en la porta objeto.
- Homogenizar la muestra con el agua y extender.
- Fijar el frotis.
- Adicionar por 1 minuto cristal violeta, lavar con agua.
- Luego solución de lugol por 1 minuto de manera que cubra todo el extendido.
- Lavar con agua.
- Adicionar por 30 segundos alcohol-cetona, lavar con agua.
- Adicionar por 30 segundos safranina, solo si la tinción es de contraste.
- Secar.
- Observar en el microscopio.



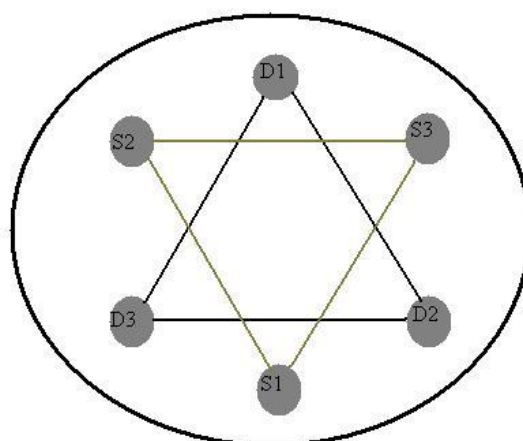
ANEXO No. 17.



**ROTULAR PLACAS
(PLACAS INVERTIDAS O HACIA ABAJO)**



**LLENADO DE CILINDROS
(PLACAS HACIA ARRIBA)**



**LECTURA DE HALOS
(PLACA HACIA ABAJO O INVERTIDA EN EL LECTOR DE ZONA)**