

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE FARMACIA



TESIS:

PARA ADOPTAR AL TITULO DE LICENCIADO QUÍMICO -FARMACÉUTICO.

TEMA:

Valoración Microbiológica de la Potencia de la Gentamicina en ampolla 20 mg / ml por el Método Cilindro-Placa, en el Laboratorio de Control Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas. En el periodo Febrero-Diciembre 2013.

AUTORES:

- ❖ Arely Aracely Andino Blanco.
- ❖ Lidia Skarlette Coronado Mercado.
- ❖ Mireldi de Jesús Dolmus Téllez.

TUTOR: MSC. Fernando Emilio Baca Escoto.

León, Miércoles 21 de mayo del 2014.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA.
❖ DEDICATORIA.	
❖ AGRADECIMIENTO	
❖ INTRODUCCIÓN.....	1
❖ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
❖ OBJETIVOS.....	6
❖ MARCO TEÓRICO.....	8
❖ HIPÓTESIS NULA.....	60
❖ MATERIAL Y MÉTODO.....	62
❖ RESULTADOS.....	84
❖ ANALISIS DE LOS RESULTADOS.....	95
❖ CONCLUSIONES.....	97
❖ RECOMENDACIONES.....	99
❖ BIBLIOGRAFÍA.....	101
❖ ANEXOS.....	104

DEDICATORIA

A DIOS creador del cielo y de la tierra dador de conocimientos por permitirnos ser su instrumento de sabiduría, para que estuviéramos aquí y dar nuestro aporte a la ciencia para el bien de la humanidad.

A NUESTROS PADRES: por valorar y creer en mis capacidades para llevar a cabo éste trabajo experimental, además por ser personas incondicionales, con una paciencia admirable, su constante e incondicional ayuda emocional, intelectual y económico que nos permitió llevar a cabo esta investigación.

AGRADECIMIENTO

A DIOS, Porque Jesús dice: No temas, ni desmayes porque yo estoy contigo, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo. He aquí que yo les traeré sanidad y medicina; y los curaré, y les revelaré abundancia paz y verdad. Lo que es imposible para los hombres, es posible para Dios. Porque, no nos ha dado Dios espíritu de cobardía, sino de poder, de amor y de dominio propio. Todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

A nuestros Padres, Hermanos, Esposos e Hijos y demás Familiares, Por su constante, incondicional e invaluable apoyo emocional intelectual y económico que nos permitió llevar a cabo esta investigación documental, buscando en todos y cada uno de los segundos de nuestra vida nunca defraudar su confianza. Gracias porque me han dado todo, desde la vida, educación, formación intelectual, personalidad creativa y competente.

Al Químico Farmacéutico Msc. Fernando Emilio Baca, por ser un gran tutor de tesis. No habría sido posible llevar a cabo esta investigación documental sin su ayuda, conocimientos, orientación, guía, perspicacia, apoyo, dedicación, por creer en esta investigación y por su gran amistad.

Al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. (UNAN-León). Por permitirnos realizar este estudio experimental.

Al Laboratorio de Control Microbiológico de la facultad de ciencias químicas de la UNAN-León. Por brindarnos la oportunidad de desarrollar este estudio experimental.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron, en el perfeccionamiento de nuestros estudios profesionales.

“A TODOS AQUELLOS QUE CREEN EN LA CIENCIA PARA ALCANZAR LA VERDAD



INTRODUCCION



Los antibióticos son sustancias obtenidas a partir del metabolismo microbiano para matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos, son esenciales para el ser humano en la prevención y cura de infecciones; por eso deben pasar una serie de análisis que certifiquen su calidad y eficacia.¹USP 32 (2009). Mallen, M^a.M. (2009).

De manera que una de las pruebas más importantes para estos medicamentos es la determinación de la potencia microbiológica. Bajo las condiciones adecuadas, la actividad (potencia) de los antibióticos puede demostrarse mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una sustancia de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo o por su efecto inhibitor sobre los microorganismos. ¹USP 32 (2009).

Históricamente el primero en utilizar la palabra “antibiótico” tal y como la conocemos hoy fue Marshall Ward en 1899, pero fue Salman Waksman, el descubridor de la estreptomicina, quién inmortalizó este vocablo en su uso actual. ⁵Mallen, M^a.M. (2009).

La Gentamicina es un antibiótico con propiedades bactericidas, ya que inhibe en forma irreversible la síntesis proteica a nivel del ribosoma bacteriano. El espectro de los amino glucósidos cubre bacilos gramnegativos y algunos organismos Gram positivos. Los amino glucósidos no son activos contra organismos aerobios, son generalmente activos contra la mayor parte de Enterobacteriaceae, incluyendo *Escherichiacoli*, *Proteusmirabilis*, *Proteus* indolpositivo, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia* y especies *Serratia*. Los amino glucósidos son usados concurrentemente con penicilinas antipseudomonas o ciertas cefalosporinas en el tratamiento de serias infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.⁸Palomino, J. (2003).

En el año 2002 la Br. Francis Raquel Gallardo Bravo y la Br. Marcela Guadalupe García Meza, realizaron un estudio de validación por un método de análisis cuantitativo de sulfato de Gentamicina 80 mg/ 2ml, Sulfato de amikacina 500 mg/ 2 ml, por HPLC, en el cual evaluaron la linealidad del sistema y del método, demostrando una coherente relación entre la concentración y las respuestas medidas lo que indica una buena linealidad.



Hubo una buena resolución de los picos cromatograficos ya que presentan simetría y los tiempos de retención de los analitos como Gentamicina sulfato y amikacina sulfato y la concentración de los principios activos se encuentran constantes. Obteniéndose la linealidad de método, CV: 0,00264, b: 0.999, r2: 0.99999 m: 0.99996 y como el CV \leq 2%, cumple con el criterio.³Gallardo Bravo F.R. (2002).

La efectividad de los antimicrobianos se evalúa para determinar su capacidad de otorgar protección necesaria o su efecto inhibitor contra cualquier tipo de infección viral o bacteriana. Para esto se realiza la valoración microbiológica del antibiótico que nos permite cuantificar la concentración y la potencia de un principio activo en el fármaco para obtener una medida del efecto de este comparado con la misma dosis de un estándar y validando el método para garantizar de forma consistente y permanente, la confiabilidad y validez de los datos obtenidos. La validación de la técnica permite no solo el conocimiento y los resultados del método analítico sino también el cumplimiento de las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como las de buenas prácticas de manufactura (B.P.M) de productos farmacéuticos vigentes que garantizan la calidad y eficacia de los mismos.

Por último y teniendo en cuentas las necesidades planteadas, el propósito del presente trabajo investigativo, es valorar el diseño de la metodología analítica fundamentada en el uso de la técnica microbiológica, que se aplicó sobre la muestra comercial de Gentamicina en ampolla y utilizando el microorganismo de prueba *staphylococcus epidermidis*, en el área del laboratorio del control microbiológico de la facultad de ciencias químicas de la U.N.A.N-León. Según la USP 32, el método de validación de dicho antibiótico es electroquímico, pero en nuestro país no existen los equipos electroquímicos, por lo cual valoraremos la potencia de la Gentamicina en ampolla de 20mg/1ml por Cuantificación, con el fin de facilitar el entendimiento del ejercicio en la valoración de sustancias antimicrobianas por el método cilindro /placa.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



¿Cómo determinar la potencia antibiótica de la Gentamicina en ampolla 20mg/ml por el método cilindro/placa en el laboratorio de control microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas UNAN- León?



OBJETIVOS

OBJETIVOS



❖ **General:**

- Valorar la potencia antibiótica de la Gentamicina en ampolla 20 mg/ml en el laboratorio de microbiología de la facultad de ciencias químicas U.N.A.N-León. En el periodo Febrero-Diciembre 2013.

❖ **Específicos:**

- Evaluarla influencia de las condiciones de trabajo en el método general de valoración cilindro/placa.
- Determinar la relación dosis-respuesta de la Gentamicina en ampolla 20mg/ml utilizando el método general de valoración microbiológica Cilindro-placa.
- Calcular la Repetibilidad del método general de valoración microbiológica Cilindro-Placa.
- Calcular el porcentaje de potencia antibiótica encontrada utilizando el método general de valoración microbiológica Cilindro-placa.



MARCO TEORICO
MARCO TEORICO



ANTIBIOTICO: El término antibiótico fue propuesto por Selman A. Waksman, descubridor de la estreptomicina, para definir sustancias dotadas de actividades antimicrobianas y extraídas de estructuras orgánicas vivientes.⁵Mallen, M^a.M. (2009).⁸Velandia, JC. (2011).

DEFINICION: Los antibióticos son sustancias medicinales seguras que tienen el poder para destruir o detener el crecimiento de organismos infecciosos en el cuerpo. Los organismos vivientes pueden ser bacterias, virus, hongos, o los animales minúsculos llamados protozoos. Un grupo particular de estos agentes constituyen las drogas llamadas antibióticos, del Griego anti ("contra") y bios ("vida"). ⁸Velandia, JC. (2011).

Algunos antibióticos son producidos por organismos vivientes. Otros son en parte o totalmente sintéticos es decir, producidos artificialmente. Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo.⁸Velandia, JC. (2011).

El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de estos.⁸Velandia, JC. (2011).

Los antibióticos pueden desempeñar las funciones de:

- ❖ **Bacteriostáticos:** (Bloquean el crecimiento y multiplicación celular) o bactericidas (producen la muerte de las bacterias). Para desempeñar estas funciones, los antibióticos deben ponerse en el contacto con las bacterias.⁸Velandia, JC. (2011).

- ❖ **Bactericidas:** Eliminación irreversible de los gérmenes en periodo de reproducción o reposo sin daño para el microorganismo. Las condiciones previas son:



dosificación óptima, necesaria duración terapéutica, concentración suficiente donde este localizada la infección.⁸Velandia, JC. (2011).

La acción bactericida in vitro se desarrolla en tres fases:

- ❖ **Fase de latencia:** Generalmente corta, dura unos 5 - 15 minutos es probable que entonces tenga lugar la penetración en la célula bacteriana.⁸Velandia, JC. (2011).
- ❖ **Fase de muerte:** Inhibición del crecimiento o muerte de los gérmenes. El número de bacterias que sobrevive disminuyen espontáneamente mientras dura la acción letal si la concentración es constante.⁸Velandia, JC. (2011).
- ❖ **Fase tardía:** La reducción de gérmenes disminuye, pero sin que cese por completo. Esta fase también se puede llamar persistencia. (Thrum y Bocker, 1971).⁸Velandia, JC. (2011).

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

SEGÚN SU ESPECTRO:

- ❖ **Antibióticos de amplio espectro:** Actúan sobre una amplia gama de bacterias Gram positivas y gramnegativas, y también contra *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Espiroquetas* y *Actinomycetos*. Ej. tetraciclinas, cloranfenicol.⁸Velandia, JC. (2011).
- ❖ **Antibióticos de espectro limitado:** Actúan sólo contra cocos Gram positivos y gramnegativos, bacilos Gram positivos y espiroquetas. Ejemplo: penicilina.⁸Velandia, JC. (2011).
- ❖ **Antibióticos de espectro reducido:** Actúan sólo contra un sector limitado de gérmenes. ⁸Velandia, JC. (2011).

SEGÚN SU MECANISMO DE ACCION:



❖ **Inhibidores de la pared celular:**

-**Penicilinas:** (actúan sobre bacterias en crecimiento), Amino penicilinas, Acilamino penicilinas.

-**Cefalosporinas:** (son bactericidas, más eficaces que las penicilinas contra las Gram (-). La primera se obtuvo de un *Cephalosporium* aislado en el mar cerca de cloacas de Cerdeña.

-**Cicloserinas:** (*Streptomyces orchidaceus*, ej.: (cicloserina).

-**Bacitracinas A, B y C** (no se usan mucho en clínica. Eficaz contra *Neisseria*. No se absorbe bien por vía oral y por vía parenteral puede producir lesiones renales).

-**Gluco péptidos (b-lactámidos)**, ej: vancomicina, ristocetina, etc.

-**Monolactámidos** (b-lactámidos)

-**Carbapenem.**

-**Fosfomicinas** (descubierto en España).

NOTA: El ácido clavulánico, el sulbactam y tazobactam no tienen actividad antimicrobiana "per se", pero son inhibidores de la b-lactamasa, por lo que se combinan con las penicilinas clásicas para que estas sean más activas.

⁸Velandia, JC. (2011).

❖ **Antimicrobianos que actúan sobre membranas celulares:** Son bastante tóxicos, por ello suelen ser de uso oral. Entre estos tenemos los siguientes:

-**Poli péptido cíclico**, ej.: tirocidina, gramicidinas, polimixinas, bacitracina, etc.

-**Antibióticos ionóforos**, ej.: valinomicina, sideromicina, etc.
No suelen usarse en clínica pues son tóxicos para todas las células.

-**Gramicidina.**



- **Antibióticos anti fúngicos poliénicos:** Forman poros por los que sale K. Suelen ser de uso tópico pues son relativamente tóxicos en sangre. Solo actúan sobre membranas con esteroides por ello no actúan contra bacterias. Ej.: nistatina, anfotericina B, tolnaftato, etc.⁸Velandia, JC. (2011).

-**Antisépticos comunes fenólicos,** Ej.: hexaclorofeno, etc.

-**Antisépticos catiónicos,** ej.: clorhexidina (habitane), etc.⁸Velandia, JC. (2011).

❖ **Inhibidores de ácidos nucleicos:** Muchos de ellos se emplean en quimioterapia del cáncer. Ej.: azaserina, daunomicina, actinomicina D.

Entre estos están:

-**Rifamicinas:** Contra ARN polimerasas.

-**Nitroimidazoles,** Ej.: omidazol, etc.

-**Colorantes intercalantes.** No son antibióticos "sensu strictu". Ej: acridinas.

-**Quinolonas o fluoroquinolonas:** Contra la subunidad A de la ADN girasa (enzima topoisomerasa implicada en la replicación del ADN). Ocupan el 4º lugar en el consumo de antibióticos. Suelen añadirse a piensos, aunque en muchos países europeos (esencialmente los nórdicos) están prohibidos para este uso. Ej.: nalidíxico, ciprofloxacino, esporfloxacino, alafloxacino, etc.⁸Velandia, JC. (2011).

❖ **Inhibidores de la función ribosómica:**

- **Aminoglucósidos:** dada su toxicidad pueden ocasionar problemas renales y óticos. Ej.: estreptomina, gentamicina, tobramicina, neomicina, etc.

-**Nito y Nitrofurantoína**

-**Tetraciclinas (o):** Son de amplio espectro. Contra estreptococos, bacilos Gram (-), espiroquetas, Rickettsias. Cada vez se usan menos pues aparecen muchas cepas resistentes.



- **Aminofenoles:** Son de amplio espectro. Actúan sobre la subunidad 50 S. Ej.: cloranfenicol, lincosamina, etc.

- **Macrólidos:** Son bacteriostáticos. Ej.: Eritromicina, Roxitromicina.⁸Velandia, JC. (2011).

❖ **Inhibidores metabólicos:** Son de síntesis química, por tanto, no son antibióticos "sensu strictu".

-**Sulfonamidas:** Descubiertas en 1.935 por Domagk. Son bacteriostáticos de amplio espectro. Hay muchas Gram (-) resistentes. Ej.: prontosil, sulfisoxazol, etc.

-**Trimeropríma.** Etc.⁸Velandia, JC. (2011).

SEGÚN FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Por muchos años la susceptibilidad bacteriana se ha medido a través de pruebas in vitro, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Este número luego era comparado con las concentraciones séricas o plasmáticas del antibiótico, alcanzadas con las dosis habituales del mismo. Esto no tiene en cuenta la farmacocinética o la farmacodinamia de cada antibiótico en particular. Cada clase de antibiótico es metabolizada en forma diferente por nuestro organismo. No es lo mismo un betalactámico, con escasa penetración celular, que un macrólido que se concentra a nivel intracelular. Esto es lo que llamamos farmacocinética: absorción, distribución, eliminación.⁸Velandia, JC. (2011).

Por otro lado está la farmacodinamia que intenta comprender las relaciones entre las drogas y sus efectos, tanto deseables (muerte bacteriana en nuestro caso) como indeseables. Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a la forma en que producen la muerte o inhibición bacteriana en antibióticos tiempos dependientes y concentraciones dependientes. En el caso de los tiempos dependientes (betalactámicos y macrólidos) el éxito de la terapéutica viene dado por mantener concentraciones por encima de la CIM por el mayor tiempo posible interdosis. ⁸Velandia, JC. (2011).



En el caso de las concentraciones dependientes el éxito terapéutico viene dado por lograr un buen pico sérico de concentración (Pico/CIM) o una buena área bajo la curva, dependiendo de cada droga. ⁸Velandia, JC. (2011).

SEGÚN SU ESTRUCTURA QUIMICA

- ❖ Amino glucósidos
- ❖ Anfénicoles
- ❖ Antimicobacterianos
- ❖ Cefalosporinas
- ❖ Glucopeptidos
- ❖ Lincosaminas
- ❖ Macrólidos
- ❖ Penicilinas
- ❖ Quinolonas
- ❖ Sulfamidas
- ❖ Diaminopirimidinas
- ❖ Tetraciclinas
- ❖ Poli peptídicos

Velandia, JC. (2011).



ANTIBIÓTICO ESPECIFICO DE ESTUDIO

GENTAMICINA:

Descubrimiento: La historia de los amino glucósidos comienza en 1944 con la estreptomicina. La aparición posterior de kanamicina en 1957 y, más tarde, de gentamicina y tobramicina constituyeron verdaderos avances en el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos gramnegativos, de manera que dichos antimicrobianos se convirtieron en el tratamiento habitual de estas infecciones. En la década de 1970, los amino glucósidos semisintéticos, dibekacina, amikacina y netilmicina demostraron la posibilidad de conseguir compuestos que fueran activos contra cepas bacterianas que habían desarrollado mecanismos de resistencia frente a los amino glucósidos iniciales y mostrar un perfil toxicológico distinto. El uso amplio de amino glucósidos puso de manifiesto problemas como toxicidad, resistencia bacteriana y sobreinfección y se comprobó que la molécula de amino glucósido no podía ser modificada para reducir su toxicidad sin disminuir al mismo tiempo su actividad antimicrobiana. Por ello, la investigación y el desarrollo de nuevas moléculas de amino glucósidos ha sufrido una ralentización llamativa, por no decir que ha llegado a un punto muerto. Palomino, J. (2003).

La Gentamicina es un antibiótico bactericida de amplio espectro. Pertenece al grupo de los amino glucósido, activo contra gérmenes Gram negativos y Gram positivos, incluyendo cepas de *proteus*, *Serratia* y *Pseudomonas*. Palomino, J. (2003).

Nombre Genérico: Gentamicina Sulfato.

Peso molecular: 575.6 g/mol.

Nombres Comerciales: Gentamina; Glevomicina; Plurisemina; Rupegen; G.Larjan; Gentaflam; G. Biocrom; G. Fabra; G. Richet; Genticol.

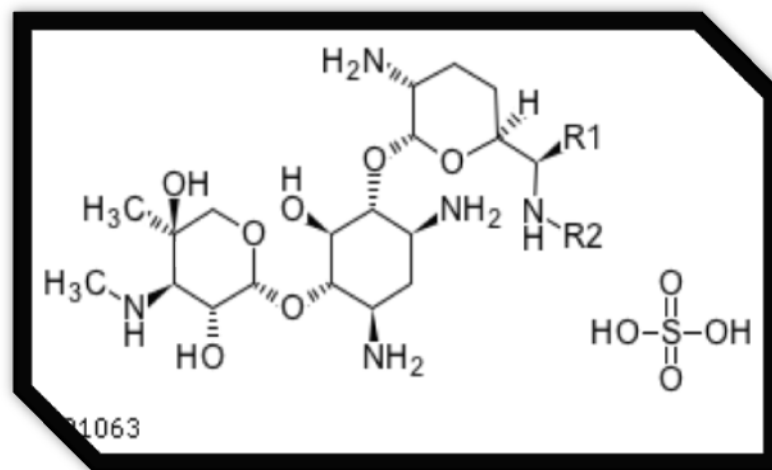


Nombre según la IUPAC:

2-[4,6-diamino-3- [3-amino-6-(1-methylaminoethyl) tetrahydropyran-2-yl] oxy-2-hydroxy-cyclohexoxy]-5-methyl- 4-methylamino-tetrahydropyran-3,5-diol.

Formula Empírica: C₂₁H₄₃N₅O₇H₂S₀₄.

Formula Estructural:



Los amino glucósidos se clasifican en dos grupos: Todos contienen un anillo aminociclitol unido por enlaces glucosídicos a dos o más Azúcares (generalmente amino azúcares).

- ❖ **Amino glucósido con aminociclitol:** (Aminociclitol desoxiestreptamina, Familia Kanamicina, Familia Gentamicina).
- ❖ **Aminociclitol sin amino glucósido:** (Espectinomicina). Palomino, J. (2003).



PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS:

- ❖ Los miembros más conocidos de esta familia de antibióticos contienen, además de uno o varios amino azúcares, un aminociclitol (alcohol cíclico con grupos aminos) unidos por un enlace glucosídico, por lo que realmente son aminoglucósidos-aminociclitoles. Palomino, J. (2003).

- ❖ Tienen carácter básico.
- ❖ Tienen efecto bactericida.
- ❖ Necesidad de la presencia de oxígeno en el medio para entrar en la célula.
- ❖ Estado de agregación: Solución.
- ❖ Color: Amarillento.
- ❖ Punto de ebullición: 100-101°C.
- ❖ Densidad: 1,01-1,03 g/ml.
- ❖ pH: 6,0-6,5.
- ❖ Solubilidad en agua: Totalmente soluble. Palomino, J. (2003).

Mecanismo de Acción (Farmacodinamia)

Consiste en interferir en la síntesis normal de proteína originando proteínas no funcionales en microorganismo susceptibles. Para ejercer su acción deben de ingresar en la célula bacteriana. Esto ocurre en dos etapas por un mecanismo de transporte activo, en la primera fase el ingreso a la célula depende del potencial transmembrana generado por el metabolismo aeróbico. La segunda fase es de ingreso acelerado y se ve favorecido por la unión previa del amino glucósido al ribosoma bacteriano. Ciertas condiciones que reducen el potencial eléctrico de la membrana anaerobia o el bajo pH del medio disminuye el ingreso de estos compuestos al citoplasma bacteriano una vez dentro de la célula, los amino glucósidos se unen de manera irreversible a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano, esta unión interfiere con la elongación de la cadena peptídica, también causan ruptura incorrectas del código genético formándose proteína anómala.



Algunas de estas son proteínas de membrana y el resultado es la formación de enlaces que permiten el ingreso de más drogas a la célula. Palomino, J. (2003).

Los amino glucósidos muestran efecto pos antibiótico frente a bacterias Gram positivas y gramnegativas. Existe una correlación entre el incremento de la dosis de amino glucósidos y mayor duración del efecto. Palomino, J. (2003).

FARMACOCINÉTICA: ADME.

La farmacocinética de los amino glucósidos se ve afectada por muchos factores que pueden ser significativos por la pequeña diferencia entre la concentración terapéutica y la tóxica lo que refuerza la necesidad de control. Palomino, J. (2003).

- ❖ **Administración:** Los amino glucósidos no se absorben por el tracto gastrointestinal, de manera que hay que administrarlos por vía parenteral. Por vía intramuscular se absorben totalmente, obteniéndose la concentración máxima ($C_{máx}$) sérica entre 30 y 90 min. Por vía intravenosa se recomienda administrarlos mediante perfusión durante 15-30 min, y si la dosis es elevada (caso de mono dosis), el tiempo de perfusión se debe incrementar hasta 30-60 min para evitar la aparición de bloqueo neuromuscular. No se recomienda su administración en las cavidades pleural y peritoneal por la posibilidad de absorción rápida y toxicidad subsiguiente. Palomino, J. (2003).

- ❖ **Distribución:** Se distribuyen libremente en el espacio vascular y en el líquido intersticial de la mayoría de los tejidos, debido a su escasa unión a proteínas y alto nivel de solubilidad. El volumen de distribución es de 0,2-0,3 l/kg. Atraviesan escasamente las membranas biológicas con la excepción de las células tubulares renales y las del oído interno, que muestran una cinética de captación de amino glucósidos saturables. Una hora después de su administración, la concentración urinaria es entre 25 y 100 veces superior a la plasmática y se mantiene elevada



durante varios días. La administración en aerosol consigue en la secreción bronquial mayor concentración que la administración parenteral. Palomino, J. (2003).

- Atravesan mal la barrera hematoencefálica, de manera que cuando se desea conseguir niveles adecuados en el líquido cefalorraquídeo se recomienda la administración intraventricular o intratecal. En el recién nacido la difusión a través de la barrera hematoencefálica es mejor. Difunden bien al líquido sinovial, consiguiéndose niveles sólo algo menores que los plasmáticos. La inyección subconjuntival proporciona niveles adecuados en el humor acuoso, pero ni la administración parenteral ni la subconjuntival consigue niveles eficaces en el humor vítreo, por lo que, en caso de endoftalmitis, hay que recurrir a la administración intravítrea. Palomino, J. (2003).

- ❖ **Excreción:** Todos los amino glucósidos son excretados por filtración glomerular sin alteración metabólica previa. A través de la hemodiálisis logra eliminarse aproximadamente el 50% de la concentración de la gentamicina en sangre y en la diálisis peritoneal cerca del 25%. Más del 90% de la dosis administrada se recupera sin modificar en la orina durante las primeras 24 h; el resto es lentamente reciclado en la luz tubular y puede ser detectado en la orina durante un tiempo superior a 20 días. Gentamicina, tobramicina y netilmicina alcanzan concentraciones urinarias de 100 y 300 g/ml tras dosis intramuscular de 1 mg/kg e intravenosa de 2 mg/kg, respectivamente. Tras una dosis de 7,5 mg/kg de amikacina, por vía intramuscular o intravenosa, la concentración urinaria llega hasta 700-800 g/ml. La semivida sérica de gentamicina, tobramicina y netilmicina es de 2 h con función renal normal y la de amikacina entre 2 y 3 h. se acorta en caso de enfermedad febril y se prolonga en caso de deterioro de la función renal. Palomino, J. (2003).



ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE ACCIÓN:

Grupos de los amino glucósidos:

- ❖ Amikacina: Gérmenes Gram positivos y Gram negativos (Amplio espectro).
- ❖ Espectinomicina y derivados: Específicamente usada contra *Neisseriagonorrhoeae* (Gonorrea).
- ❖ Framicetina: Especifico contra gérmenes entero patógenos, como *salmonellas*, *shigellas*, *bacilos coli*, *proteuspseudomonas*. En algunas infecciones bacterianas dérmicas.
- ❖ Gentamicina sulfato: Actúa sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Especialmente *Escherichiacoli*, especies de *proteos* (indol-positivo e indol-negativo, *pseudomonas auriginosa*, *klebsiella*, *enterobacter*, *serratia*, *citrobacter*, *staphylococcus* (coagulasa-positivo y coagulasa-negativo incluyendo cepas resistentes a penicilina y meticilina).

Los anaerobios como *bacteroides o clostridium* y la mayoría de las especies de *streptococcus* suelen ser resistentes a los amino glucósidos.

- ❖ Kanamicina y derivados: infecciones bacterianas entéricas.
- ❖ Sisomicina: Actúa en *Eshericiacoli*. *Proteus*. *Pseudomonasauruginosa*, *serratia*, *estafilococos*, incluyendo cepas resistentes a la penicilina G y alas *isoxazolilpenicilinas*.
- ❖ Tombramicina: Actúa en *Pseudomonasaeruginosa*, *proteus*, *Eschericiacoli*, especies *Klebsiella*, *estafilococos aureus* (coagulasa positivo y negativo).(PLM) 13ª edición C.A.D (1981).



POSOLOGÍA:

❖ **Pediátrica:** 1mg/kg de peso al día aplicada cada 8 o 12 horas.

-En infecciones Graves: 3mg/Kg de peso al día aplicada 8 o 12 horas.

Duración del tratamiento en todos los casos: La duración usual del tratamiento es de 7 a 10 días. En infecciones difíciles o complicadas la prolongación del tratamiento puede ser necesaria. En tales casos se recomienda hacer prueba de las funciones renal o auditiva.

❖ **Adultos:** pacientes con función renal normal 1mg/kg de peso cada 8 o 12 horas.

-En infecciones graves: de 3 a 5 mg/kg de peso cada 8 horas, disminuyendo la dosis cuando el paciente mejore.

Pacientes con disfunción renal: primera dosis: igual a las indicadas después de la mitad o menos, de acuerdo al criterio del médico. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

INDICACIONES:

Infecciones urinarias, infecciones primarias de la piel (impétigo, foliculitis superficial, furunculosis), infecciones secundarias de la piel (dermatitis infecciosa, infecciones de tejido blando incluyendo quemaduras complicadas, infecciones de las vías respiratorias, infecciones postquirúrgicas, infecciones del sistema nervioso central, infecciones óseas, septicemia, artritis gonocócicas.(PLM) 13ª edición C.A.D (1981).



INTERACCIONES:

La Capreomicina, Anfotericina B parenteral, Ácido A cetil Salicílico, Bacitracina, Bumetanida, Cefalotina, Cisplatino, Ciclosporina, Ácido Etacrinico, Furosemida, Paronomicina, Streptozina, Vancomicina, Bloqueadores, Neuromusculares, Anestésicos, Hidrocarburos halogenados por inhalación, Antihistamínicos, Meclozina, Etionamida, Antimiasténico, Indometacina, Malation, Polimixina parenteral y Analgésicos Narcóticos pueden aumentar la probabilidad de aparición de ototoxicidad y nefrotoxicidad o bien interferir con la acción terapéutica de la gentamicina cuando se emplean concomitantemente. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

EFECTOS ADVERSOS MEDICAMENTOSOS

- ❖ Reacciones cutáneas en caso de hipersensibilidad.
- ❖ El uso de este producto puede provocar disfunción vestibular o coclear en pacientes con función renal normal en los cuales no se siguen las instrucciones para su empleo. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

PRESENTACIONES:

- ❖ Ampollas: 20-40-80 mg.
- ❖ Gotas oftálmicas: 0,3%.
- ❖ Pomada oftálmica: 0,1 - 0,3%. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).



CONTRAINDICACIONES Y PRECAUCIONES:

- ❖ Antecedentes de hipersensibilidad, Uremia y disfunción renal grave, en cuyo caso la gentamicina solo está indicada cuando la infección amenaza la vida del paciente.
- ❖ Aunque los estudios realizados en animales no han demostrado ningún efecto teratógeno, no se recomienda la gentamicina durante el embarazo o menos que el medico lo juzgue conveniente. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

- ❖ Consérvese a temperatura ambiente a no más de 30 grados centígrados.
- ❖ Dejar fuera del alcancé de los niños. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

RESISTENCIA MICROBIANA:

La resistencia bacteriana a los amino glucósidos no es muy frecuente, y cuando ocurre, es debido a:

- ❖ Producción de enzimas inactivantes, en plásmidos. 13 enzimas. Ej.: fosfotransferasas, acetilasas y adenilasas.
- ❖ Disminución de la entrada del antibiótico.
- ❖ Alteración de las proteínas ribosómicas diana. (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).



ORGANISMO DE PRUEBA PARA LA GENTAMICINA AMPOLLA

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS.

DESCRIPCION:

Los estafilococos Gram-positivos coagulasa-negativo son las bacterias más comúnmente aisladas en los laboratorios microbiológicos. Son patógenos nosocomiales asociadas a complicaciones infecciosas tras cirugía vascular injertos o de biomateriales médicos implantados. El *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos representan los mayores componentes de la microflora de la piel y mucosa humana. A pesar de su alta frecuencia como contaminante, el *S. epidermidis* se ha convertido en un importante patógeno nosocomial, en parte probablemente debido al uso incrementado de dispositivos médicos como catéteres endovenosos de permanencia prolongada, injertos vasculares, válvulas cardíacas y articulaciones protésicas, representando el 24% de los patógenos nosocomiales encontrados en la sangre .GARCIA APAC C. (2003).

Los pacientes neutropénicos e inmunosuprimidos, así como los portadores de catéteres endovenosos o dispositivos protésicos son los que se encuentran en los grupos de mayor riesgo. Debido a la alta frecuencia como contaminante pero al mismo tiempo su importante rol patógeno, la interpretación de un único cultivo positivo a *S. epidermidis* es subjetivo, ya que en algunos pacientes en riesgo de bacteremia, la fiebre y otros síntomas inespecíficos puede corresponder a otras causas. Aureus es el patógeno más importante en el género y es también el patógeno nosocomial más importante de quirúrgica del *S. aureus*, se conoce poco sobre el mecanismo de patogénesis del *S. epidermidis*. Sin embargo, se reconoce como característica de muchas cepas la formación de un 'biofilm' fabricado en base al ácido teicoico, el cual normalmente forma parte de la pared del estafilococo. Esta capa los protege de la acción de los neutrófilos y a su vez disminuye la penetración de los antibióticos.GARCIA APAC C. (2003).

El *S. epidermidis*, dado que es un microorganismo de transmisión nosocomial, tiene una alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos. Cerca del 90% producen beta lactamasas,



mientras que 60% al 80% son resistentes a la meticilina. Además, estas bacterias suelen ser resistentes a macrólidos, lincosaminas, amino glucósidos y fluoroquinolonas. El fármaco de elección es la vancomicina y la duración del tratamiento varía de acuerdo al tipo de infección. GARCIA APAC C. (2003).

CARACTERÍSTICAS:

(1). *S. epidermidis*, se caracteriza por ser coagulasa negativo y novobiacina sensible, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante. GARCIA APAC C. (2003).

(2) Es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama). GARCIA APAC C. (2003).

(3). La susceptibilidad antimicrobiana que presenta, el *S. epidermidis* ha desarrollado resistencia a la meticilina en forma paralela al desarrollo de resistencia del *S. aureus*, pero mostrando tasas mucho más elevadas que esta última, y que ha ido incrementándose de manera importante en los últimos 20 años. Mientras que a inicio de los '80s se indicaban tasas de resistencia a la meticilina del 20%, en 1999 estas llegaron al 80%. Esta es la razón por la cual en la actualidad se considera que la vancomicina es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este germen. GARCIA APAC C. (2003).



PATOGÉNESIS DE S. EPIDERMIDIS

El estafilococos coagulasa negativos (CNS) son ampliamente distribuido sobre la superficie del cuerpo humano; es la especie más frecuentemente aislados y los responsables más comunes de infecciones nosocomiales relacionadas con biomateriales implantados (catéter; válvula cardiaca protésica, neuroquirurgicas etc.). En el pasado, CSN fueron considerados no patógenos. En efecto, estos organismos con frecuencia contaminan sangre y otras muestras clínicas, presentando así dificultades, tanto para el personal de laboratorio y clínica en distinguir entre cepas contaminantes e invasivas. GARCIA APAC C. (2003).

VALIDACION MICROBIOLÓGICA

Según la Food and Drug Administration (FDA) Validación es establecer una evidencia documentada que provea un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá, de forma consistente, un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad. ²Monografía AEFI (2001).

La cualificación se refiere esencialmente al funcionamiento de la maquinaria, equipos y aparatos de laboratorio en los cuales se ha de demostrar experimental y documentalmente que funcionan de acuerdo con el uso previsto. ²Monografía AEFI (2001).

La validación se refiere a procesos, sistemas y métodos; si tenemos en cuenta que la validación es establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza correctamente y produce un producto que está dentro de las especificaciones predeterminadas (nivel de calidad exigido), es evidente que antes de validar un proceso, hemos de tener cualificado la maquinaria necesaria para realizar aquel ensayo. ²Monografía AEFI (2001).



Existen dos tipos de validación:

- ❖ Prospectiva: Se efectúa antes de la comercialización del producto.
- ❖ Retrospectiva: Se efectúa con los datos obtenidos mediante ensayos posteriores realizados sobre el producto ya comercializado.

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA VALIDACIÓN

El proceso de validación es un elemento clave para asegurar que se cumplen con los objetivos de Garantía de Calidad.²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Por ello la validación debe servir como una garantía de calidad del equipo, procedimiento, proceso, material, actividad, sistema que intervenga en la fabricación del producto farmacéutico y que por lo tanto influye de forma muy directa en la calidad del mismo. ²Monografía AEFI (2001).
- ❖ Debe demostrarse que el equipo, proceso, material, actividad o sistema es homogéneo, fiable y reproducible para conseguir un producto que cumpla las especificaciones establecidas dentro de unos intervalos definidos.²Monografía AEFI (2001).
- ❖ Esta demostración debe documentarse adecuadamente con las pruebas que se hayan realizado y los datos que se hayan obtenido, según el protocolo de validación definido.²Monografía AEFI (2001).



CONSIDERACIONES PRELIMINARES DE LA VALIDACIÓN

Durante los estudios de investigación y desarrollo farmacéutico, el producto debe definirse cuidadosamente en relación a sus características físicas, químicas y tecnológicas.

Es importante trasladar las características del producto a las especificaciones como base para la descripción y control del producto. ²Monografía AEFI (2001).

La documentación de los cambios realizados durante el desarrollo, provee adecuada trazabilidad, la cual puede ser utilizada más tarde para futuros problemas. ²Monografía AEFI (2001).

Deben considerarse todos los aspectos pertinentes del producto los cuales influyen sobre la seguridad y eficacia tales como estabilidad, biodisponibilidad y fiabilidad del proceso. Se han de establecer rangos o límites para cada característica. Estos rangos se han de expresar en términos fácilmente mesurables. ²Monografía AEFI (2001).

La validez y aceptación de las especificaciones debe verificarse a través de los ensayos del producto y sobre bases científicas, durante las fases iniciales de desarrollo y de producción. ²Monografía AEFI (2001).

Una vez demostrado que las especificaciones son aceptables, es importante que cualquier cambio de ellos, este de acuerdo con los procedimientos de control de cambios. ²Monografía AEFI (2001).

CEPAS CONTROL MEDIO DE CULTIVO Y DILUYENTES:

Antes de iniciar la validación del método microbiológico es imprescindible contar con cepas de microorganismos control que constituyen “el reactivo estándar biológico”. Estos microorganismos serán necesarios para la comprobación del método de control del producto no estéril y estéril los aislados frecuentemente en la zona de fabricación o los utilizados para valoraciones de antibióticos y ensayo de eficacia de la conservación antimicrobiana. ²Monografía AEFI (2001)



CEPAS CONTROL MEDIO DE CULTIVO Y DILUYENTES:

USP 24	Farmacopea Europea 3ª edición
Escherichia coli. ATCC 8739	Escherichiacoli. ATCC 8739
Pseudomonas eruginosa ATCC 9027	Pseudomonas eruginosa ATCC9027
Salmonella sp.	Salmonella abony NCTC 6017
Bacilos subtilis ATCC6633	Bacilos subtilis ATCC6633 (suspensión de esporas).
Clostridiumsporogenes ATCC11437	Clostridiumperfringens 13124
Micrococos luteus ATCC9341	
Bacteroides vulgatus ATCC8482	
Cándida albicans ATCC 10231	Cándida albicans ATCC2091 o ATCC10231
Aspergillus niger ATCC 16404	Aspergillus niger ATCC 16404
Staphilococusaureus ATCC6538	Staphylococcus Aureus ATCC6538 o ATCC6538 p
	Zygosaccharomycesrouxii NCYC 381

Las cepas de microorganismos tienen un origen e idoneidad conocida así como una estabilidad bioquímica que minimiza la variabilidad durante la validación, debida al reactivo biológico. El crecimiento y la preparación del microorganismo 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 sino poblaciones de células. Los datos generados en el ensayo son menos variables si las poblaciones celulares son homogéneas.²Monografía AEFI (2001).

En este sentido sean descritas diversas técnicas de mantenimiento de cepas encaminadas a mantener esta estabilidad. El crecimiento y preparación de microorganismo determinan el estado fisiológico de las células, el cual tiene influencia directa en el resultado de los ensayos.²Monografía AEFI (2001).



Los ensayos microbiológicos no utilizan células individuales sino poblaciones de células. Los datos generados son menos variables si las poblaciones de celulares son homogéneas.²Monografía AEFI (2001).

Según se indica en la Farmacopea y USP el cultivo de un microorganismo que se vaya a utilizar como Inoculo en una validación debe proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original. ²Monografía AEFI (2001).

Un subcultivo se define como la resiembra del microorganismo 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 un subcultivo. La conservación se puede efectuar por congelación o por liofilización. El método de liofilización consiste en Inocular el microorganismo de un medio crio protector, hacer una congelación rápida con nitrógeno líquido y después pasarlo al liofilizador.²Monografía AEFI (2001).

CULTIVOS DE ORIGEN

Se entiende como tales los descritos en farmacopea y que proceden de colecciones estandarizadas como American Type Cultura Collection (ATCC) Colección española de cultivos tipo (CECT) u otras colecciones. Estas cepas pueden obtenerse de distintas proveedores. ²Monografía AEFI (2001).

La Forma de presentación puede variar de fuentes a otras. Algunos proveedores los presentan en formas de asas en cuyo extremo hay el cultivo liofilado, otros en forma de discos y otros en ampollas con el microorganismo liofilado en su interior.²Monografía AEFI (2001).



Deben de seguirse las instrucciones del proveedor para su recuperación (medio de mantenimiento, temperatura y atmosfera de incubación. Para comprobar la pureza de las cepas es aconsejable sembrar por agotamiento a partir de este cultivo original. Es conveniente identificar las colonias de este aislamiento mediante tinciones y pruebas bioquímicas. ²Monografía AEFI (2001).

CONSERVACIÓN Y ARCHIVO

El método que describimos a continuación consta de dos partes una de ellas es el mantenimiento de microorganismos de trabajo y la otra la conservación de la cepas primarias obtenidas a partir de originales. Este procedimiento es válido para la preparación de cultivo de gérmenes de rápido crecimiento. En el caso de especies de *Neisseria*, *haemophilus*, mico bacterias y Hongos puede requerirse alguna modificación. ²Monografía AEFI (2001).

La conservación se puede efectuar por congelación o por liofilización. El método de liofilización consiste en inocular el microorganismo en un medio crio protector, hacer una congelación rápida con nitrógeno líquido y después pasarlo al liofilizador. ²Monografía AEFI (2001).

Se explica el método por congelación por ser el más accesible para un laboratorio de control biológico. ²Monografía AEFI (2001).



CONGELACIÓN DE MICROORGANISMOS:

MEDIOS DE CONGELACIÓN

Para la congelación se utilizan medios crioprotectores:

- ❖ Caldo de TSB más un 10-15% de glicerol.
- ❖ Caldo infusión corazón-cerebro más un 10-15 % de glicerol.
- ❖ Medio selectivo adecuado más un 10-15 % de glicerol.²Monografía AEFI (2001).

Se pueden preparar en el laboratorio, repartiéndolos en viales con 2-4 ml y esterilizándolos en autoclave a 121° C, 20 minutos.²Monografía AEFI (2001).

CULTIVOS DE TRABAJO

A partir del cultivo primario pueden utilizarse cuatro subcultivos de trabajo y de estos realizar dos o tres siembras, según las necesidades. Aumentar el número de resiembras incrementa el riesgo de alteración fenotípica. Se recomienda no realizar más de 5 pases desde la cepa original. ²Monografía AEFI (2001).

Para obtener un subcultivo de trabajo, se siembra sobre medio inclinado o 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 cuatro semanas, si bien es preferible mantenerlos en nevera a 2-8 C.²Monografía AEFI (2001).



VALIDACIÓN DEL ARCHIVO DE MICROORGANISMOS

Para validar el método de conservación debe realizarse el ciclo de congelación, descongelación y revivificación un mínimo de tres veces con todas las cepas de microorganismos que el laboratorio utilice para sus controles internos.²Monografía AEFI (2001).

Se efectuara una identificación mediante pruebas bioquímicas cada vez que haya duda o semestralmente.²Monografía AEFI (2001).

CONFIRMACION DE LA PUREZA E IDENTIDAD DE UN CULTIVO

Se efectuara una identificación mediante pruebas bioquímicas cada vez que haya duda o semestralmente. ²Monografía AEFI (2001).

SUSPENSIONES NORMALIZADAS O ESTANDARIZADAS

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados. Normalmente, la Farmacopea para ensayos de recuperación microbiana en presencia de producto (validación de la esterilidad o grado de contaminación) indica que se siembren un número determinado de microorganismos de cultivos recientes. Es por ello, que se debe tener un sistema para asegurar el número aproximado de microorganismos que tenemos en una suspensión sin tener que esperar los resultados de un recuento (mínimo 24 horas de espera) ni trabajar a ciegas.²Monografía AEFI (2001).



La manera más fácil de estandarizar una 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 espectrofotómetro a una longitud de onda determinada, tendremos aproximadamente el mismo número de microorganismos. ²Monografía AEFI (2001).

MEDIOS DE CULTIVO

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 nutritivas y selectivas propiedades de crecimiento que se pueden obtener de medios de cultivo de dos maneras. ²Monografía AEFI (2001).

❖ Preparados por un laboratorio externo fabricante de medios de cultivo:

Se exige un certificado de análisis de cada lote de medio donde consten los resultados obtenidos en los ensayos de esterilidad y de las propiedades nutritivas y selectivas, así como 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 las farmacopeas. ²Monografía AEFI (2001).

Además es recomendable efectuar controles periódicos en el momento de la recepción en el laboratorio para comprobar la calidad de los medios. Se realizan controles visuales, controles de esterilidad y controles de crecimiento/inhibición similares a los que se describen para los medios preparados a partir de medios deshidratados. ²Monografía AEFI (2001).



❖ **Preparados en el laboratorio a partir de medios deshidratados:**

Los medios se preparan según las indicaciones del fabricante utilizando agua purificada (como mínimo de calidad Farmacopea Europea). En este caso se exige el certificado analítico de cada lote de medio deshidratado. Además el laboratorio debe efectuar ensayos que demuestren esterilidad y las propiedades nutritivas y selectivas de los medios de cultivo preparados a partir de medios deshidratados. ²Monografía AEFI (2001).

Para los medios nutritivos generales se utilizan las cepas que se indican en las Farmacopeas. ²Monografía AEFI (2001).

Para los medios selectivos se utilizan microorganismos que presenten buen crecimiento y otros cuyo crecimiento este inhibido en este medio. Los ensayos se deben hacer para cada lote de medio que se prepare. ²Monografía AEFI (2001).

Es aconsejable también asignar a los medios preparados en el laboratorio una fecha de caducidad. Esta fecha depende del medio que se trate y las condiciones de conservación. ²Monografía AEFI (2001).

MEDIOS SÓLIDOS O LÍQUIDOS

❖ **Comprobación de las propiedades nutritivas:**

Para comprobar las propiedades nutritivas se preparan suspensiones de microorganismos que contengan aproximadamente 10 a la 2 ufc/ml. Se inocula con 1ml de suspensión y por separado una placa de agar (en profundidad o en superficie) o un tubo, frasco de medio. ²Monografía AEFI (2001).



Se suelen utilizar *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, para medios de recuento total y *Candida albicans* para medio de recuento de hongos. Se incuban en las condiciones adecuadas para el microorganismo y se comprueba la presencia de crecimiento.²Monografía AEFI (2001).

❖ **Comprobación de propiedades selectivas:**

Se prepara la suspensión que contenga aproximadamente 10 a la 2 ufc/ml de un microorganismo que crezca abundantemente en el medio y de otro cuyo crecimiento este inhibido. Se debe mantener un registro de preparación de medios de cultivo así como de todos los controles efectuados.²Monografía AEFI (2001).

❖ **FICHAS DE MEDIOS DE CULTIVOS Y DILUYENTES**

La información que entra a formar parte de la ficha se extrae de farmacopea, catálogos o manuales así como de certificados de análisis de medios de cultivos facilitados por los proveedores que se archivarán conjuntamente con las fichas y podrán ser consultadas frente a cualquier anomalía observada.²Monografía AEFI (2001).

❖ **DILUYENTES**

La función de un diluyente es dispersar o diluir el producto a examinar. Las farmacopeas oficiales recomiendan varios diluyentes los cuales ya están ya validados en el sentido de que no interfieren en la viabilidad de los microorganismos. ²Monografía AEFI (2001).



EJEMPLOS DE DILUYENTES:

Usp 24	Farmacopea europea 3 ^o ra edición
	Solución peptona da con tampón de fosfatos y cloruros de sodio PH 7.0
	Solución peptonada con tampón de fosfatos cloruro sódico y polisorbato 80 (0.1%,1%)PH 7,0
Caldo lactosado	Caldo lactosado
Caldo con peptona de caseína y soja- TSB	Caldo con peptona de caseína y soja- TSB
solución tampón de fosfatos y PH 7.2	
Caldo con peptona de caseína y soja lecitina (0.5%) y polisorbato 20 (4.0%).	

Existen productos que por sus características precisan para su disolución o dilución diluyentes que no están recomendados en la farmacopea oficial. En este caso antes de validar el método de análisis debe realizarse la validación del diluyente. Como ejemplo de diluyentes que deben ser validados podemos citar:²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Diluyentes de beerens.
- ❖ Caldo letheen.
- ❖ Solución salina isotónica.
- ❖ Solución de Ringer.



La adición de inactivadores específicos a un diluyente de la farmacopea.²Monografía AEFI (2001).

UTILIZACION DE UN DILUYENTE NO RECOMENDADO POR FARMACOPEA

Cuando es necesario utilizar un diluyente que no está recomendado en farmacopea, se debe comprobar que no presenta propiedades bactericidas ni fúngico y las que puedan afectar la viabilidad de los microorganismos y demostrar que es capaz de recuperar el mayor número posible de unidades formadoras de colonias en el producto aunque el nivel de contaminación sea muy bajo.²Monografía AEFI (2001).

MICROORGANISMO DE ENSAYO Y DILUYENTE ESTANDAR

Los microorganismos recomendados por la farmacopea Europea 3^{ra} se describen como cepa control. ²Monografía AEFI (2001).

Como diluyente estándar se toma uno de los recomendados en la farmacopea y se utilizan en paralelo con el diluyente a validar.²Monografía AEFI (2001).

PROCEDIMIENTO DE LA VALIDACION DE UN DILUYENTE.

1-La validación de un nuevo diluyente se realiza comparando la recuperación de microorganismo con el diluyente a validar en relación con la del diluyente estándar. ²Monografía AEFI (2001).

2-Se preparan suspensiones estandarizadas de los microorganismos por separado tal y como se describe en el apartado cepas patrón. Se realizan diluciones en paralelo con el diluyente a validar y el estándar hasta obtener una concentración celular aproximada de 100 ufc/ml. ²Monografía AEFI (2001).



3-Se efectúa un recuento en placa de última dilución de los dos diluyentes utilizando como medio de soporte de crecimiento para bacterias TSA e incubando a 30 -35°C y para hongos y levaduras agar de saboread con cloranfenicol incubando a 20 -25 °C se siembra 10 placa por diluyente y microorganismo.²Monografía AEFI (2001).

MATERIAL

- ❖ Tubos con 10 ml diluyente estándar.
- ❖ Tubos con 10 ml del diluyente a validar.
- ❖ Resto de un material propio de un laboratorio de microbiología.²Monografía AEFI (2001).

ADICION DE NEUTRALIZANTE-USP 24

Según USP 24 el procedimiento para la validación de un diluyente al cual se ha añadido un neutralizante específico de las propiedades antimicrobiana del producto debe demostrar al mismo tiempo la eficacia y la toxicidad de dicho neutralizante sin pedir la recuperación de la cepa control. Para ello propone comparar la recuperación en los casos siguientes:²Monografía AEFI (2001).

Diluyente estándar + inóculo.

Diluyente más neutralizante + inóculo.

Diluyente + neutralizante + producto + inóculo.

El número de réplicas es de tres para cada ensayo a), b), C). ²Monografía AEFI (2001).

El promedio de UFC recuperadas a partir del producto testado C) no debe ser mayor al 70 % respecto al recuperado a partir del inóculo control b). ²Monografía AEFI (2001).



TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los resultados se realizan mediante una t de student si se comparan pares de resultados o bien mediante un análisis de la varianza (ANOVA) si se comparan grupos de resultados, en este último caso si existen diferencias significativas entre los distintos grupos , se aplicara el test de dunnett utilizando a) como control.
²Monografía AEFI (2001).

RESULTADOS

Después del periodo de incubación se efectúan los recuentos de todas las placas recopilando el resultado en una tabla y se realiza un tratamiento estadístico para verificar que los resultados obtenidos con el diluyente estándar son comparables a los obtenidos con el diluyente a validar.²Monografía AEFI (2001).

ESTERILIDAD

La referencia para el ensayo de esterilidad y su validación es farmacopea europea suplemento 2000 y no hay cambios en el suplemento 2001. ²Monografía AEFI (2001).

EFECTUACION DE LA VALIDACIÓN

Cuando se aplica el ensayo de esterilidad a un nuevo producto o cuando hay un cambio significativo en la formulación de un producto. ²Monografía AEFI (2001).

Cada vez que se realiza una modificación en las condiciones experimentales del ensayo.



La validación puede desarrollarse simultáneamente con el ensayo de esterilidad de rutina pero los resultados estarán condicionados a los obtenidos en la validación. Así en la validación del ensayo de esterilidad del producto se debe obtener un crecimiento comparable al del control en máximo 3 días para las bacterias y máximo de 5 para los hongos. Si los resultados no son comparables el producto posee propiedades antimicrobianas que deben eliminarse, por lo que las condiciones en las que sea efectuado el ensayo de esterilidad deben de modificarse.²Monografía AEFI (2001).

En la tabla siguiente se resumen los microorganismos adecuados para utilizar en la validación del ensayo de esterilidad. (Crecimiento de las propiedades nutritivas de los medios de cultivo) y en el ensayo de validación.²Monografía AEFI (2001).

Medio	Microorganismo		Incubación	
	Especie	Cepa	Temp°c	Duración
Caldo tioglicolato	Bacterias aerobias	ATCC6538	32.5±2.5	3 días
	s.aureus	ATCC6633		
	b.subtilis (*)	ATCC9027		
	p eruginosa			
Caldo con peptona de caseína y soja.	Bacterias anaerobias	ATCC19404	32.52.±5	3 días
	c.sporogenes			
	Hognose	ATCC 10231	22.52.±5	3 Dias
	c.albicans	ATCC 16404		
	a. Niger			

b. subtilis (*) crece en TSB.²Monografía AEFI (2001).



ENSAYO DE VALIDACIÓN

Para cada uno de los microorganismos especificados en la tabla realizar un ensayo de esterilidad como se indica en la farmacopea, utilizando el método habitual con las siguientes modificaciones:²Monografía AEFI (2001).

FILTRACIÓN ATRAVES DE MEMBRANA

Después de filtrar a través de membrana los contenidos de envases a ensayar se efectúan dos de los lavados que indica la farmacopea y en la tercera fracción del líquido de lavado se añade un inóculo de 10 a 100 UFC de uno de los microorganismos de ensayo. ²Monografía AEFI (2001).

INOCULACIÓN DIRECTA

Después de transferir los contenidos del envase a ensayar a un medio de cultivo, se añade un inóculo de 10 a 100 UFC de microorganismo viales.²Monografía AEFI (2001).

En ambos casos (filtración membrana inoculación directa) se realizan paralelo un control de crecimiento con ausencia de producto como control positivo. Se incuba según las especificaciones de la tabla. ²Monografía AEFI (2001).

Si después de la incubación se obtiene un crecimiento microbiano rápido y claramente comparable al observado en el control positivo, el producto no posee actividad antimicrobiana por lo tanto el ensayo se puede realizar sin modificación.²Monografía AEFI (2001).



Si después de la incubación no se obtiene un crecimiento rápido el producto posee actividad antimicrobiana que no ha sido eliminada por lo tanto se han modificar las condiciones del ensayo.²Monografía AEFI (2001).

MÉTODOS DE ENSAYO DE ELIMINACIÓN DE PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS:

- ❖ Neutralización química.
- ❖ Neutralización por dilución.
- ❖ Eliminación de las propiedades de inhibición. ²Monografía AEFI (2001).

INTERPRETACIÓN

La interpretación del ensayo de esterilidad de un producto que tenga propiedades antimicrobianas y un producto que nos la tenga, debe ser distinta por lo que el diseño del protocolo varía. En función de los resultados de los distintos microorganismos también tendremos que ampliar el número de réplicas de los microorganismos que presenten resistencia.²Monografía AEFI (2001).

EFICACIA DE LA CONSERVACION ANTIMICROBIANA

El ensayo de la eficacia de la conservación antimicrobiana permite demostrar que un producto (especialidad farmacéutica, cosméticos,etc.)Tiene una actividad antimicrobiana determinada (debida a la adición de sustancias antimicrobianas o debidas a su composición) que lo protege de los efectos adversos causados por una eventual contaminación microbiológica durante el almacenamiento o el uso. ²Monografía AEFI (2001).

El ensayo consiste en inocular una cantidad de producto, si es posible en su envase original, con diferentes suspensiones de microorganismos por separado. A distintos intervalos de



tiempo se realizan recuentos tomando alícuotas de 1g o 1ml de producto para detectar microorganismos supervivientes. ²Monografía AEFI (2001).

En el momento de afrontar la validación de este método se debe tener en cuenta:

- ❖ Microorganismos según las “cepas de control”.
- ❖ Medios de cultivos.
- ❖ Métodos de recuentos:

Antes de iniciar el ensayo de eficacia de la conservación antimicrobiana se debe disponer de un método de recuento de microorganismos supervivientes validado. Con la validación del método se demuestra que este es capaz de recuperar los microorganismos supervivientes en niveles mínimos de contaminación (10-100 ufc por g o ml de producto). ²Monografía AEFI (2001).

La recuperación de los microorganismos se puede demostrar al inicio del ensayo. Cuando se inocula el producto se hace un recuento a las 0 horas y se compara el resultado con un recuento en paralelo de una solución de peptona inoculada con los mismos microorganismos y en la misma proporción. ²Monografía AEFI (2001).

Es necesario también tener la certeza de que el método es capaz de recuperar los microorganismos a niveles bajos de contaminación lo cual debe incluirse en la validación del método. ²Monografía AEFI (2001).

La viabilidad del inóculo se puede demostrar si la solución de peptona inoculada (control positivo) se conserva a la misma temperatura que el producto inoculado y se realizan recuentos a determinados intervalos de tiempo. Se considera que el inóculo es viable si se obtienen recuentos del mismo nivel o superior que los obtenidos a las 0 horas. ²Monografía AEFI (2001).



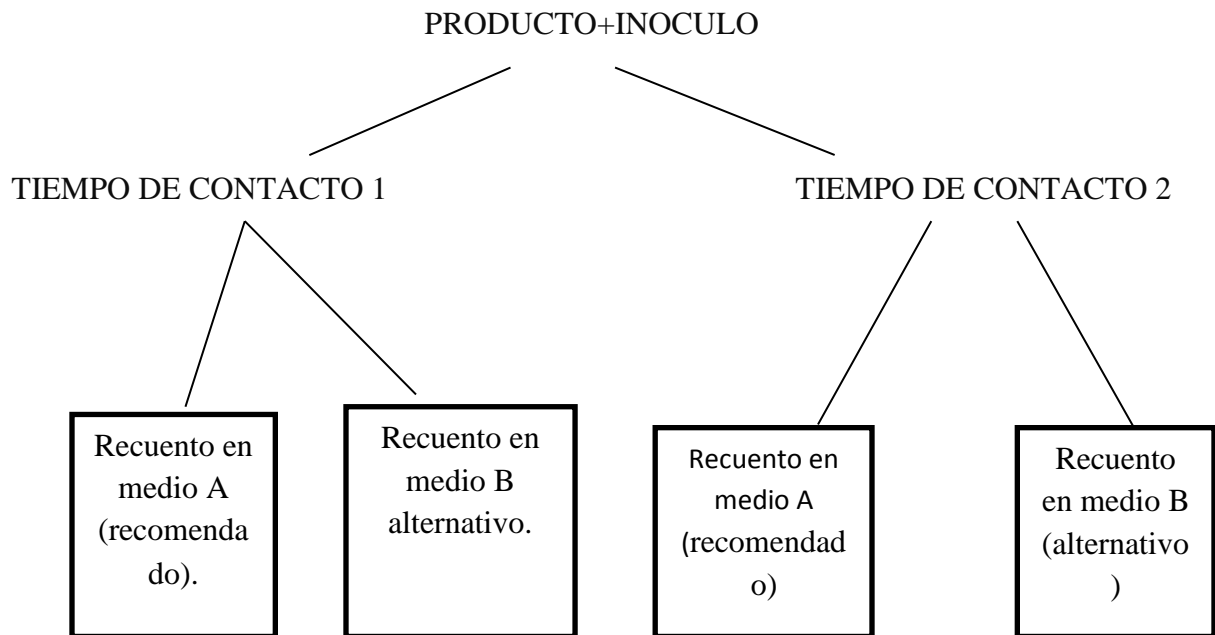
Debe tenerse en cuenta que en los ensayos de validación se utilizan cepas de laboratorio que no han sido expuestas anteriormente a agentes antimicrobianos. ²Monografía AEFI (2001).

Sin embargo, en muchas ocasiones los métodos analíticos intentan recuperar microorganismos que han estado expuestos a agentes antimicrobianos y que pueden estar debilitados o dañados. ²Monografía AEFI (2001).

En USP24 se establece un ensayo para validar la recuperación de microorganismos dañados cuando se utilizan medios de cultivo alternativos a los recomendados en la farmacopea. Se trata de poner en contacto el microorganismo con el producto y después comparar la recuperación del mismo en un medio de cultivo recomendado y en el medio de cultivo alternativo. ²Monografía AEFI (2001).

La exposición de los microorganismos al producto debe realizarse por lo menos en dos periodos de tiempo tras los cuales se demuestre que han sobrevivido menos de 100 UFC/ml, salvo en el caso de aquellos productos antimicrobianos que no permiten la recuperación de los microorganismos ni a los pocos minutos de la inoculación. ²Monografía AEFI (2001).

La comparación debe hacerse por lo menos tres veces. El medio de cultivo alternativo se considera validado si la recuperación de microorganismos en este medio no es menor que la recuperación en el medio recomendado con un error de 0,5 unidades logarítmicas. ²Monografía AEFI (2001).



1-Número de lotes a ensayar:

- ❖ Producto en desarrollo: 3 lotes a escala piloto fabricados con diferentes lotes de materias primas.²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Estabilidad: Al final del periodo de caducidad los lotes que se establezcan en el expediente de autorización. El ensayo se realiza si por el método químico se observa disminución de la concentración de conservantes. Es conveniente realizar el ensayo cuando se trate de un producto que cumple parcialmente los criterios aceptados por las farmacopeas.²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Producto sin conservantes: Se realiza para comprobar si la formulación por sí misma, sin la adición de conservantes tiene propiedades antimicrobianas. Se suele realizar en aquellos productos para los que se sospeche dicha actividad. En estos casos es posible que no se necesite adicionar conservantes o sustancias antimicrobianas. ²Monografía AEFI (2001).



- ❖ Re contaminación: Es aconsejable realizar una re contaminación en productos envasados en tarros multidosis y dependiendo del tipo de aplicación (por ejemplo, cremas o pomadas multidosis, frascos multidosis).²Monografía AEFI (2001).
- ❖ Criterios de aceptación: Las farmacopeas establecen unos criterios de aceptación según el tipo de producto y la vía de administración (tópico, oral, parenteral). Los criterios de aceptación pueden ser de tipo A (más estricto) o B cuando se considera un riesgo para el paciente, aumentar la concentración de antimicrobianos en la formula. ²Monografía AEFI (2001).

Puede ocurrir que un producto cumpla con los requisitos para todos los microorganismos excepto para un. En este caso se debe valorar el riesgo de patogenicidad del microorganismo en función de sus características y de las del producto.²Monografía AEFI (2001).

Al efectuar el ensayo con tres lotes de producto pueden obtenerse resultados contradictorios. En este caso debe repetirse el ensayo con tres lotes más de producto para decidir si se acepta la formula. También debe investigarse las causas de las discrepancias (lotes de materia prima diferentes, impurezas, productos de degradación, etc.). ²Monografía AEFI (2001).

GRADO DE CONTAMINACION MICROBIANA

El ensayo de grado de contaminación en productos no estériles esta descrito en Farmacopea Europea y en USP 24. Se describen a continuación los parámetros utilizados para validar este ensayo. ²Monografía AEFI (2001).

AEFI Catalana publico una monografía sobre este tema. En la presente monografía se amplían algunos aspectos de los descritos en la monografía publicada. ²Monografía AEFI (2001).

El laboratorio de Microbiología debe asegurar que el material con el que trabaja siempre es estéril, no obstante, cuando tomamos el producto sobre el que debemos efectuar la



validación del método de recuperación, nos podemos encontrar con que posee una contaminación microbiana intrínseca difícil de eliminar. ²Monografía AEFI (2001).

En estos casos, debemos buscar alternativas a los medios que se utilizan para la recuperación, por ejemplo el recuento con un medio que sea selectivo para el microorganismo que se inocula, o si las características del producto lo permiten, eliminar los microorganismos presentes en la muestra por filtración. ²Monografía AEFI (2001).

EXACTITUD Y PRECISION

- ❖ La exactitud es el porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo.
- ❖ La precisión expresa la variabilidad o más-menos del método analítico para determinar el grado de contaminación. Matemáticamente se expresa como coeficiente de variación (CV%). ²Monografía AEFI (2001).

Nos podemos encontrar una vez que tenemos los resultados de exactitud y precisión con que:

EXACTITUD

- ❖ La recuperación se halla dentro de los límites establecidos (70% del inóculo) para todos los microorganismos. Nuestro método es correcto. ²Monografía AEFI (2001).
- ❖ Baja recuperación para todos los microorganismos. Debemos cuestionar el método y en lo posible modificarlo para incrementar el nivel de recuperación. ²Monografía AEFI (2001).
- ❖ Baja recuperación para uno de los microorganismos y dentro de los límites para todos los demás. Si el tipo de microorganismo que tiene baja recuperación



representa un peligro para el proceso de elaboración o envasado del producto o se detecta en el ambiente de fabricación deberá implantarse un sistema de control rutinario de detección de dicho microorganismo y establecer un nivel de acción para minimizar el riesgo. En algunos productos (por ejemplo anti fúngicos) si no dispone de un inactivador específico para el principio activo, la baja recuperación puede ser atribuida a la propia naturaleza del preparado, en cuyo caso se puede repetir el ensayo contaminado. por ejemplo la dilución 1/100 de producto a una dilución superior, siempre y cuando no se sobrepase el límite de aceptación para el producto y comprobando la recuperación a estas concentraciones.²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Alta recuperación en uno o más microorganismos: Nos indica que la muestra es fácilmente contaminable, lo cual exige que se tomen medidas en los ambientes de producción y utillaje a efectos de evitar las posibles contaminaciones. Se acepta una recuperación por encima del límite superior siempre que se cumpla el parámetro de precisión.²Monografía AEFI (2001).

PRECISION

Un coeficiente de variación superior al 15-20% cuestiona nuestro sistema de trabajo. Se deben revisar todos los elementos que intervienen en el método de control (instrumental, personal) a fin de detectar el origen de las desviaciones. ²Monografía AEFI (2001).

ENSAYO DE DETECCION DE PATOGENOS

La finalidad de esta validación es comprobar si las posibilidades nutritivas y selectivas de los medios de cultivo utilizados para el ensayo de detección de patógenos quedan afectadas por la presencia del producto a examinar. ²Monografía AEFI (2001).



ENSAYO DEL PRODUCTO ERITROMICINA

En las valoraciones de la rutina cuando la linealidad del sistema ha sido demostrada, usar un ensayo de 3 puntos. Usar en cada ensayo el número de réplicas por dosis que aseguren la precisión requerida. Tomar al menos tres unidades del lote, que correspondan al principio, mitad y final del lote.²Monografía AEFI (2001).

PERIODICIDAD DE LA VALIDACION

Farmacopea Europea no indica la periodicidad de la validación, solo se requiere la validación al inicio de control del producto o cuando hay un cambio en la formulación o en el método de validación. ¹USP 32 (2009).

VALIDEZ DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido y por tanto validado el método de detección de patógenos, si se aíslan en todos los casos los microorganismos ensayados. ²Monografía AEFI (2001).

El ensayo no se considera validado cuando:

- ❖ No se aíslan los microorganismos inoculados en todos o en algunos de los lotes ensayados.
- ❖ No se aíslan los microorganismos inoculados en el control positivo.
²Monografía AEFI (2001).

Cuando esto ocurra podemos proceder de la siguiente forma:

1-En el caso de que no obtengamos recuperación de alguno de los microorganismos para todos o para algunos de los lotes. Y tampoco para el control positivo, se debe proceder a repetir el ensayo para descartar posibles fallos durante el procedimiento.
²Monografía AEFI (2001).

2- En el caso de que no obtengamos recuperación de alguno de los microorganismos ensayados para todos los lotes, y si la obtengamos para el control positivo, es



aconsejable comprobar si se recupera por el método de recuento en placa. De esta forma descartaremos que durante el periodo de incubación haya un problema de interacción del producto con el medio de cultivo selectivo (acidificación del medio, interacción entre microorganismos, etc.) que pueda afectar al crecimiento de ese microorganismo.²Monografía AEFI (2001).

3-En el caso de que no obtengamos ningún tipo de recuperación de ninguno de los microorganismos, debemos estudiar si el producto posee actividad antimicrobiana. En este caso, debemos eliminar dicha actividad por dilución, neutralización o bien filtración y repetir el ensayo. ²Monografía AEFI (2001).

INCERTIDUMBRE

La Guía para la Expresión de la Incertidumbre (GUM ISO 1993) define la incertidumbre de medición como un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos al mensurando.²Monografía AEFI (2001).

El total de la incertidumbre de un resultado de la prueba consiste en una serie de varios componentes.

En Microbiología, por lo menos tres factores están siempre implicados. ²Monografía AEFI (2001).

- ❖ La Incertidumbre del inóculo volumen.
- ❖ La Dispersión de partículas estadísticas.
- ❖ La Incertidumbre de la lectura del resultado.
- ❖ La Incertidumbre de dilución es con frecuencia un cuarto factor.²Monografía AEFI (2001).



La guía ISO incertidumbre (Anon. 1995) clasifica los métodos de estimación de la incertidumbre en dos tipos llamados tipo A y tipo B de evaluación (de la incertidumbre).

TIPOS DE INCERTIDUMBRE

❖ Tipo A de la evaluación de la Incertidumbre:

El tipo A desviación estándar (incertidumbre estándar) se calcula a partir de una serie de n independiente de mediciones paralelas x_1, x_2, \dots, x_n de la prueba de cantidad por medio de la convencional estadística fórmula de la desviación estándar experimental:

$$s(x) = s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(\bar{x} es la media aritmética).

Un tipo de evaluación puede referirse al resultado de la prueba final del procedimiento analítico o una parte de ella (por ejemplo, un volumen de medición).

Un gran número de paralelismos es esencial para una estimación del tipo A.

Por ejemplo, la incertidumbre de una estimación basada en 30 mediciones independientes es del 13%, la de una muestra de dos mediciones es considerablemente mayor, el 76% (Anon. 1995).²Monografía AEFI (2001).

❖ Tipo B de la evaluación de la Incertidumbre:

De acuerdo a la norma ISO (Anon. 1995) en la evaluación de tipo B el valor numérico de la incertidumbre de medición se calcula por otros medios que los métodos estadísticos.²Monografía AEFI (2001).



❖ **Incertidumbre Combinada:**

Por lo general, no es factible hacer serie de mediciones repetidas en la vigilancia rutinaria para obtener una estimación del tipo A de la incertidumbre de un resultado de la prueba final. Con algunos métodos químicos es posible asumir la validez general del método específico. La repetibilidad y reproducibilidad son parámetros de (precisión y estimación), determinados en un método de colaboración de rendimiento de estudios.

Existen razones por las cuales este enfoque es probable que sea menos exitoso en la microbiología. Uno de ellos es la colonia impredecible de números que varía de caso en caso y por lo general es la principal causa de la incertidumbre.²Monografía AEFI (2001).

❖ El otro es la inestabilidad de muestras.

La incertidumbre de un resultado de la prueba depende demasiado de las irrepetibles condiciones en las que una prueba se hace. El mejor enfoque en la microbiología parece ser para componer una estimación de la incertidumbre separado de la unidad de operaciones el procedimiento analítico, que se estima por cualquier medio disponible. ²Monografía AEFI (2001).

Un procedimiento matemático, llamado La Ley de Propagación de la Incertidumbre (Anon 1995), se aplica. La combinación de Incertidumbre -Estimación se basa en el reconocimiento y la lista de los más importantes componentes de la incertidumbre del proceso analítico, teniendo cuidado de evitar "doublécounting", es decir, incluida cualquier incertidumbre de los componentes más de una vez. Encontrar un valor por cada uno de los componentes de Tipo A o Tipo B y la combinación de procesos que se hace matemáticamente. Es posible componer una estimación de la incertidumbre de la medición de cualquier situación excepcional. ²Monografía AEFI (2001).



Algunos de los componentes de incertidumbre son las mejores estimaciones de las medidas de calibración en el propio laboratorio. Asimismo, el análisis de la varianza de los experimentos anteriores, y posiblemente son llevados a cabo para complementar otros fines, totalmente diferentes que pueden ser fuentes adecuadas de información sobre la variabilidad de la prueba de resultados.²Monografía AEFI (2001).

FUENTES DE INFORMACIÓN

Cuando sea necesario, otros medios de estimación se utilizan. Los medios incluyen estadística, distribuciones (Poisson, binomial) o supone la distribución de posibles valores (rectangulares y triangulares). Otros medios podrían incluir valores basados en experiencia u otra información, así como equipo de las especificaciones de los fabricantes, la literatura científica, la experiencia general del instrumento 'errores', la homogeneidad de los materiales, calibración y certificación de los informes, incertidumbre y valores indicados en los manuales. Incluso una suposición podría ser aceptable si nada más está disponible. Las fuentes de información deben indicar en el informe de la incertidumbre.²Monografía AEFI (2001).

FORMAS DE EVALUAR LA INCERTIDUMBRE (*ui*)

❖ POR LOS MÉTODOS ESTADÍSTICOS:

Evaluación de la desviación estándar a partir de una serie de observaciones ($u_i = s_i/n^{1/2}$); utilizando el método de los mínimos cuadrados o el de máxima probabilidad para evaluar la desviación estándar de los coeficientes del modelo lineal y su varianza residual; por análisis de varianza (ANOVA) para identificar y cuantificar los efectos aleatorios en ciertos tipos de mediciones. ²Monografía AEFI (2001).



❖ **LEYES:**

❖ **LEY DE DISTRIBUCIÓN:**

Normal, triangular y rectangular, U.

❖ **LEY DE PROPAGACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE:**

La incertidumbre estándar de un mensurando que depende de variables analíticas (concentración de estándar certificado, pureza, peso de muestra, factores de dilución, parámetros ambientales, datos de validación, etc.), se obtiene por combinación de las incertidumbres estándares de las diferentes observables a través de la ley de la propagación de la incertidumbre (o propagación de errores). Existen dos casos: cuando las variables son independientes y cuando están correlacionadas.²Monografía AEFI (2001).

❖ **VALORACION MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS**

La potencia de un antibiótico se estima mediante la comparación de la actividad de un producto (problema) y la de una sustancia de referencia (patrón) en presencia de un microorganismo testigo.²Monografía AEFI (2001).

La validación de los procedimientos analíticos usados para la materia prima y el producto acabado se revisó en la guía ICH (cpmp/ich/281 y 381/95). En el caso de que el método analítico este descrito en la farmacopea:²Monografía AEFI (2001).

- ❖ Si se trata de una materia prima, la validación no será necesaria, aunque se deba efectuar un chequeo de la linealidad, sensibilidad, precisión y selectividad.
- ❖ Si se trata de un producto acabado, se deberá efectuar una validación que demuestre que la precisión, selectividad y exactitud son las apropiadas.
- ❖ Si no está descrito en la farmacopea se debe realizar una validación completa.

²Monografía AEFI (2001).



Para determinar la potencia de antibióticos, se emplean dos:

Métodos Generales

- ❖ Cilindro-Placa (Difusión en agar).
- ❖ Turbidimétrico

Dependiendo de la naturaleza de la muestra a ensayar estos métodos comparan la respuesta de un microorganismo específico y sensible, frente a un antibiótico estándar de actividad conocida y una muestra, bajo condiciones idénticas de ensayo.²Monografía AEFI (2001).

La base de los ensayos por difusión en agar, es que las respuestas obtenidas frente a distintas dosis de antibiótico son proporcionales a los diámetros de halos de inhibición; en los ensayos turbidimétricos la respuesta se mide en forma de turbidez. ²Monografía AEFI (2001).

El diseño más simple para esta prueba es un ensayo con una curva estándar. Para ellos se prepara el patrón a 5 concentraciones o dosis (A, B, C, D, E, F) que mantengan entre si una relación logarítmica, y una solución de la preparación a ensayar a una concentración teórica equivalente a la intermedia del patrón (c).²Monografía AEFI (2001).

Se considera el ensayo como preliminar si la potencia de la muestra una vez interpolada en la curva construida con las respuestas del patrón es inferior al 80% o superior al 125%. En tal caso se debe preparar la muestra a una concentración teórica más centrada a la del patrón y repetir el ensayo. Otro diseño sería el del cuadrado latino, en el que la potencia del problema se determina por comparación entre una recta construida con el patrón y otra construida con el problema. ²Monografía AEFI (2001).



Las determinaciones microbianas de potencia están sometidas a variables intra e inter ensayos, por lo tanto se requieren dos o más ensayos independientes para una estimación fiable de la potencia. Se aconseja efectuar el ensayo en días diferentes. Si la potencia estimada en un segundo día, difiere significativamente de la del primero (indicado por el error estándar), se deben llevar a cabo más ensayos. ²Monografía AEFI (2001).

La combinación de resultados de un número pequeño de ensayos en diferentes días, es más fiable que un ensayo realizado un mismo día con más placas o tubos (USP Fourth Supplement, Antibiotics, Microbial Assays). ²Monografía AEFI (2001).

Los sistemas biológicos presentan una variabilidad que obliga a tener diferentes criterios para verificar y realizar ensayos. Realmente la verdadera potencia se puede encontrar dentro de un rango de valores que vendrá definido por los límites de confianza de error calculados para el ensayo, que nos darán los valores de los extremos con una probabilidad de un 95%. ²Monografía AEFI (2001).

La precisión mínima requerida para la valoración aceptable de un antibiótico materia prima o en producto acabado se explica en el capítulo de precisión en la parte de la monografía dedicada a materias primas y especialidades. El grado de precisión requerido depende de los límites de aceptación. Una especialidad acabada con un intervalo de aceptación del 95-105% o del 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 ($n>6$). Este es el caso del fabricante que debe indicar la riqueza del antibiótico en el certificado de análisis. ²Monografía AEFI (2001).

ESTIMACIÓN DE LA POTENCIA DE LA MUESTRA

Promediar los valores de transmitancia para la muestra y determinar la concentración interpolando en la línea dosis -respuesta. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución para encontrar el contenido del antibiótico en la muestra. ⁴González, JG. (1998)



DEFINICIONES DE POTENCIA

❖ Potencia real o verdadera:

La potencia de la materia prima o producto acabado cuando se realiza el ensayo.
²Monografía AEFI (2001).

❖ Potencia asignada:

Es valor nominal asignado a un producto acabado a partir de la potencia de la materia prima. ²Monografía AEFI (2001).

❖ Potencia estimada:

Potencia calculada a partir de los datos del ensayo. ²Monografía AEFI (2001).

FACTORES DETERMINANTES

La buena ejecución del método depende de que los siguientes factores sean apropiados y estén bien controlados:

- ❖ Microorganismos
- ❖ Agar
- ❖ pH
- ❖ Diámetro de los pocillos o discos(difusión en agar)
- ❖ Espectrofotómetro calibrado (turbidimetría)
- ❖ Rango de concentraciones
- ❖ Temperatura de incubación de las placas o tubos
- ❖ Tiempo de incubación.
- ❖ Tampón.

En microbiología los parámetros de validación clave son la exactitud y la precisión.



UNIDADES Y ESTANDARES DE REFERENCIA

La potencia de los antibióticos esta especificada en “unidades” o microgramos de actividad del antibiótico. Se establece y define según el estándar maestro federal designado para cada antibiótico. El Estándar de Referencia USP correspondiente se calibra según el estándar maestro.

- ❖ El concepto de “ μg ” de actividad se originó en un caso en que se consideró que la preparación antibiótica seleccionada como estándar de referencia consistía totalmente en una sola entidad química y, por lo tanto, se le asignó una potencia de 1000 “ μg ” por mg. ¹USP 32 (2009).
- ❖ Luego se comprendió que dichas preparaciones tenían una actividad equivalente a un número de “ μg ” determinado el estándar de referencia original. En la mayoría de los casos, no obstante, los “ μg ” de actividad equivalen exactamente a los “ μg ” (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 “ μg ” de actividad se han definidos en términos de una sola de dichas formas; cuando la sustancia antibiótica consta de un solo número de componentes muy similares químicamente pero con diferente actividad antibiótica o cuando las potencias de una familia de antibióticos se expresa en términos de un estándar de referencia que consta de un solo miembro que; no obstante; podría ser heterogéneo. ¹USP 32 (2009).
- ❖ 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 necesariamente a los “ μg ” (peso) de la sustancia antibiótica. ¹USP 32 (2009).



HIPOTESIS
HIPOTESIS



La potencia de la Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml no está relacionada con el crecimiento del microorganismo de prueba, *staphylococcus epidermidis*.



MATERIAL Y MÉTODO



- ❖ **Tipo de estudio:** Experimental, analítico.

- ❖ **Muestreo:** No probabilístico.

- ❖ **Área de estudio:** El estudio se realizó en el laboratorio de control microbiológico de la facultad de ciencia químicas de la UNAN-León.

- ❖ **Unidad de análisis:** Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml.

- ❖ **Universo:** Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml de un laboratorio nacional. El número de lote, tamaño de lote, fecha de fabricación del producto, fecha de caducidad no puede ser revelado debido al compromiso de confidencialidad y ética del laboratorio de control de calidad de medicamento.

- ❖ **Muestra:** Fue de 16 ampollas de 20 mg/1ml del antibiótico Gentamicina. No hubo criterio de selección, porque fueron tomados al azar.

- ❖ **Criterios de inclusión:**
 - Que sea el antibiótico específico Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml.

 - Que sean ampollas del antibiótico específico Gentamicina 20 mg/1ml.

 - Que el antibiótico en estudio Gentamicina 20 mg/1ml haiga sido fabricado en un laboratorio nacional.

- ❖ **Criterios de exclusión:**
 - Que no sea el antibiótico específico Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml.



- Que no sean ampollas del antibiótico específico Gentamicina 20 mg/1ml.
- Que el antibiótico en estudio de Gentamicina en ampolla de 20 mg/1ml no sea fabricado por un laboratorio nacional.

❖ **Métodos de Recolección de Información**

Secundaria:

- Revisión documental (Libros, diccionarios enciclopédicos, tesis.)
- información de sitios web (Internet).

❖ **Plan de análisis de los resultados:**

Los análisis estadísticos para la valoración del método cilindro/placa de Gentamicina en ampolla de 20mg/1ml se realizaron mediante el programa Excel, para determinar los parámetros de la validación.

❖ **Instrumentos o recolección de la información:**

Medición de halos:

Alrededor de los cilindros metálicos que contenían antibiótico al cual el microorganismo en estudio es susceptible, aparecieron zonas de inhibición (halos).

Los diámetros de estas zonas se midieron cuidadosamente por la parte posterior de la placa, ubicando a esta en el lector de zona, contraluz. En unidades de milímetro (mm), rotando la placa, y la regla del lector iniciando la medición desde las marcas de los halos con una aproximación de 0,1mm la regla del lector de zona y marcando hasta donde llega el diámetro del halo de inhibición siguiendo un giro directo para evitar una lectura errónea de las marcas de los halos inhibitorios.



❖ **Interpretación de los resultados**

Se llevó a cabo relacionando los diámetros de las zonas de inhibición con la concentración inhibitoria mínima que le correspondió al antibiótico ensayado.

❖ Variables:

- Potencia antimicrobiana.
- Concentración.
- Microorganismo.
- PH.



OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.

VARIABLES	CONCEPTO	INDICACIONES	ESCALA
Potencia antimicrobiana	En la persistencia del efecto antimicrobiano después de la exposición del organismo al antibiótico	0-0.01	cuantitativa
Concentración	Es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente, donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el disolvente la sustancia que disuelve al soluto, y la disolución es el resultado de la mezcla homogénea de las dos anteriores.	Concentración mínima inhibitoria y concentración máxima bactericida. 20(mg/ml) 80mg/ ml	Cualitativa Cuantitativa



OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.

VARIABLES	CONCEPTO	INDICADORES	ESCALA
Microorganismo	Es un ser vivo que solo puede visualizarse con el microscopio. Tiene una organización elemental y pueden ser unicelulares o multicelulares.	<p>Recuento directo.</p> <p>Medida de la masa de células en suspensión.</p> <p>Recuento de viables en medio sólido.</p> <p>Medida del número de partículas.</p> <p>Medida de parámetros bioquímicos.</p> <p>Medida de actividad metabólica</p>	<p>Cuantitativo</p> <p>Cualitativo</p>
PH	Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución.	6-8	Cuantitativo



VALIDACION DEL MODELO MATEMATICO

Los pasos seguidos para la validación de la valoración del antibiótico fueron:

REPETIBILIDAD

Es la medida de error indeterminado o variabilidad \pm del método analítico para determinar el grado de contaminación y matemáticamente se expresa como el coeficiente de variación: $CV < 5\%$ para límites de confianza de 90% -125%.²Monografía AEFI (2001).

Precisión intermedia

Se realizó el ensayo microbiológico en el mismo laboratorio en idénticas condiciones por dos analistas en diferentes días.

Se determinó a partir de un blanco de excipientes al que se le añadió la cantidad de antibiótico correspondiente al 100% teórico del límite de aceptación.

Después de realizar la valoración (9réplicas para cada una de las concentraciones) se obtienen unos resultados con los cuales se calcula:

- ❖ La media: \bar{x}
- ❖ La desviación estándar (variabilidad del método): s
- ❖ La desviación estándar de la media: $S_{\bar{x}}$
- ❖ El coeficiente de variación: cv
- ❖ Los límites de confianza de la media
- ❖ Los límites de confianza de la desviación estándar



- ❖ La tolerancia, que expresa la variabilidad del método respecto al intervalo entre las especificaciones superior e inferior. ²Monografía AEFI (2001).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

- ❖ CV<5% para unos límites de confianza 90-125%.
- ❖ Tolerancia: <30%.

LINEALIDAD

Se determina en el caso de valoraciones de antibióticos y requiere la utilización de logarítmicos de las concentraciones para obtener regresiones lineales. ²Monografía AEFI (2001).

CONSISTE EN:

1-Demostrar que la recta de regresión construida con el logaritmo de la concentración (0.1 ug/ml) del antibiótico patrón y la muestra cumplen con los parámetros de regresión lineal y análisis de varianza. ²Monografía AEFI (2001).

2-Demostrar que la recta de regresión construida con la concentración (0.1ug/ml) de la muestra del antibiótico a la misma dosis que la recta del patrón, presentan una relación dosis-respuesta y que cumplen con los parámetros de regresión lineal y análisis de varianza.²Monografía AEFI (2001).

3-Demostrar que las dos rectas (patrón y muestra) cumplen con el test de coincidencia.

Para construir las rectas de regresión lineal, se prepararon 5 diluciones de antibiótico en progresión geométrica. ²Monografía AEFI (2001).



4-Una vez efectuado el ensayo, obtuvimos unos resultados que son los que utilizamos para los cálculos de las rectas.²Monografía AEFI (2001).

5-Para aceptar la validación de la linealidad, se efectuó el ensayo de comprobación de las rectas patrón-muestra por triplicado. ²Monografía AEFI (2001).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

- ❖ Coeficiente de determinación: $r^2 >$ o igual 0.95.
- ❖ Cumplimiento de las condiciones de aceptación:
 - Normalidad de los resultados.
 - Homocedasticidad de los residuales.
- ❖ Análisis de la varianza:
- ❖ Test F1 para la regresión lineal o pendiente: $P < 0.05$ (significativo).
- ❖ Test F2 para la linealidad, falta de ajuste o curvatura. $P > 0.05$ (no significativo).
- ❖ Test de coincidencia o bien de paralelismo. ²Monografía AEFI (2001).

LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Están implícitos y no precisan de una determinación. Ya que cada laboratorio evalúa la metodología y número de ensayos a efectuar en función de las características del método analítico, de la muestra, coste, personal, y tiempo disponible, etc. ²Monografía AEFI (2001).



El ensayo se diseñó de forma que permitiera examinar la validez del modelo matemático. Bajo estas condiciones deben verificarse los ensayos de valoración microbiológica con una probabilidad $P= 0.05$. ²Monografía AEFI (2001).

DISEÑO DE VALORACION DEL:

METODO CILINDRO-PLACA

1. Las valoraciones microbiológicas aumentan su precisión con la separación de fuentes relativamente grandes de posibles errores y desviaciones, mediante diseños experimentales adecuados.
2. En la valoración cilindro-placa, las comparaciones esenciales están restringidas a las relaciones entre las mediciones del diámetro de la zona de inhibición de crecimiento dentro de las placas, sin tener en cuenta la variación entre placas en su preparación y posterior manipulación. ¹USP 32 (2009).
3. Se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición de microorganismos, cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración del antibiótico. ¹USP 32 (2009).
4. El agar para los medios de cultivo de siembra estaba enteramente claro cuando líquido, y homogéneo, opaco-translucido cuando sólido. con una translucencia satisfactoria que permitió el crecimiento de colonias del microorganismo profundas en los tubos de ensayo con rosca.
5. No contenía material, sedimento, o pedazos de algodón o de papel aluminio, que obstaculizaran el desarrollo de las colonias del microorganismo. ¹USP 32 (2009).



CONTROL DE TEMPERATURA

Se requirió un control termostático en varias de las etapas de la valoración microbiológica: durante la preparación del cultivo del microorganismo y del inóculo, así como durante la incubación de las placas. Se mantuvo la temperatura de las placas de valoración a $\pm 0,5^\circ$ de la temperatura seleccionada.

RECEPTACULOS DE VALORACION EN CILINDRO-PLACA

- ❖ Se utilizaron placas de Petri de vidrio (aproximadamente de 20x100mm) con cubiertas de un material adecuado y cilindros de acero inoxidable con las siguientes dimensiones, cada una de las cuales tiene una tolerancia de $\pm 0,1$ mm: diámetro externo 8mm, diámetro interno 6mm y longitud 10mm. ¹USP 32 (2009).
- ❖ Se limpiaron con cuidado para eliminar todos los residuos, con un baño de alcohol puro. Se esterilizaron en el horno por 3 horas a una temperatura de 170C-180C.

¹USP 32 (2009).

MEDIOS PARA LA PREPARACION DEL INOCULO.

Los medios requeridos para la preparación del inóculo de los organismos de prueba están hechos con los ingredientes mencionados en la USP 32.

La cual indica que estos pueden sufrir ligeras modificaciones de los ingredientes individuales, o medios deshidratados reconstituidos siempre y cuando los medios resultantes posean las mismas propiedades de promoción de crecimiento o superiores y produzcan una curva de respuesta estándar similar. ¹USP 32 (2009).



LOS MEDIOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO SON LOS SIGUIENTES:

MEDIO 1.

Peptona.....	6,0 g.
Digerido pancreático de caseína.....	4, 0 g.
Extracto de levadura.....	3,0 g.
Extracto de carne.....	1,5 g.
Dextrosa.....	1,0 g.
Agar.....	15,0 g.
Agua.....	1000ml.

PH después de esterilización: 6, 6±0,1 (USP 32 (2009)).

MEDIO 11. IGUAL QUE EL MEDIO 1 EXCEPTO EL PH FINAL.

Peptona.....	6,0 g.
Digerido pancreático de caseína.....	4, 0 g.
Extracto de levadura.....	3,0 g.
Extracto de carne.....	1,5 g.
Dextrosa.....	1,0 g.
Agar.....	15,0 g.
Agua.....	1000ml.

PH final después de esterilización 8,3±0,1.



PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO:

1-Se pesaron 6.5 g de agar/200ml con un total de 13 g/400ml (capa base) y 3.55 g /100ml (capa siembra).

2-Se disolvieron en agua destilada estéril a ebullición. Se taparon, con una cubierta de papel aluminio y se esterilizaron en autoclave por vía húmeda a T 121 C.¹USP 32 (2009).

ANTES DE REALIZAR UNA VALORACIÓN:

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO

- ❖ Se preparó la solución amortiguadora #3 de fosfato de potasio a 0,1 M, PH de 8,0 g/mol requerida para el antibiótico en análisis.
- ❖ Se pesó y disolvió 16,73 g de fosfato di básico de potasio y 0,523 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 ml de agua.



PREPARACION DEL INOCULO

Condiciones de Incubación				Composición sugerida del Inoculo		
Organismo de prueba y número ATCC.	Medio	Temperatura (°)	Tiempo	Medio	Cantidad (mL por 100 mL)	Antibiótico Valorado
<i>S.epidermidis</i> 12228	1	35 a 37	24 horas	11	0.03	Gentamicina

- ❖ Siendo el factor de dilución: 1.25.
- ❖ El medio #1 la suspensión de prueba.
- ❖ El medio #11 para mantenimiento.

RESIEMBRA DEL MICROORGANISMO EN ESTUDIO:

- 1- Se retiro el cultivo reciente del organismo, con 3 ml de solución salina estéril, agitación magnética.
- 2- Para inocular la superficie de 100 ml del medio agar 11 para ese organismo, se adicionaron 10 ml a cada tubo de ensayo con rosca. Se esterilizo y después de este tiempo se procedió a con el asa el microorganismo de un cultivo reciente y luego se aplicó la técnica de rayado en forma pareja sobre la superficie del agar en cada tubo, se incubo a la temperatura 35-37C durante aproximadamente 18-24h. ¹USP 32 (2009).



- 3- Una vez finalizado este tiempo de incubación, se preparó la suspensión madre recogiendo el cultivo de la superficie en 9 ml de solución salina estéril con 25 % de transmitancia.
- 4- La USP32, determina la cantidad de suspensión madre que se debe utilizar por cada 100 ml de medio como Inoculo, por lo tanto se añadió 0.03 ml de suspensión.
- 5- En el ensayo microbiológico los resultados fueron satisfactorios con zonas de inhibición de aproximadamente 19 a 23 mm de diámetro, produciendo una relación de dosis- respuesta.

PREPARACION DEL ESTANDAR

1. Para preparar la solución madre, se disolvió 0.05g del Estándar de Referencia USP. En buffer, # 3, se tomó 1 ml de esta solución y se diluyo en 50 ml d buffer, se tomó una alícuota de 0.25 y se diluyo en 50 ml de buffer. Hasta la concentración requerida según se indica.
2. Se conservó en un refrigerador el tiempo que no era usado.
3. Se usó dentro del periodo indicado.
4. El día de la valoración se prepararon a partir de la solución madre 5 diluciones, siguiendo una secuencia tal que la dilución media tubo la concentración (0.1 ug/ml).¹USP 32 (2009).

PREPARACION DE LA MUESTRA

- 1-Se determinó la cantidad de muestra a medir para la valoración del antibiótico en estudio.
- 2-Se disolvió 2.25 ml de muestra en 50 ml de buffer # 3 hasta el aforo. Se tomó 1 ml y se disolvió en 50 ml de buffer, se tomó una alícuota de 0.25 y se disolvió en 50 ml de buffer. Hasta la concentración requerida según se indica.



3-Sobre esta suposición, se preparó el día de la valoración una solución madre (S3) y una dilución de muestra según se especifica para el antibiótico en estudio, pero con el mismo diluyente final, buffer #3. La valoración con 5 niveles de estándar requirió un solo nivel de la Muestra. ¹USP 32 (2009).

PREPARACION DE LOS MATERIALES

Todos los materiales y equipos se mantuvieron limpios, perfectamente enjuagado con agua destilada para eliminar cualquier residuo que pudiera afectar el crecimiento de microorganismo de prueba. El material de vidrio para mantenimiento, manejo, transferencia y desarrollo de los microorganismos, se esterilizo por calor seco a 170C-180C durante 3horas. ¹USP 32 (2009).

- ❖ Cajas Petri de 100mm x 20mm.
- ❖ Tapas de porcelana porosa.
- ❖ Cilindros de acero inoxidable de las siguientes medidas: 10mm \pm 0.1mm de longitud, 8mm \pm 0.1mm de diámetro externo, 6mm \pm 0.1mm de diámetro interno.
- ❖ Tubos de vidrio con tapones de plástico, resistentes a la esterilización.
- ❖ Calibración del espectrofotómetro a una longitud de onda 530-580 nm.
- ❖ Baño maría.
- ❖ Autoclave por vía húmeda.
- ❖ Horno esterilizador.
- ❖ Incubadora.

- ❖ Erlenmeyer 250ml.
- ❖ Pinzas estériles.
- ❖ Balón de 50 ml.
- ❖ Espátula.
- ❖ Algodón.
- ❖ Papel de aluminio.



ESTERILIZACION

- ❖ Jabón líquido.
- ❖ Cloro.
- ❖ Algodón.
- ❖ Papel aluminio.
- ❖ Alcohol puro.
- ❖ Alcohol gel.
- ❖ Servilletas.

EQUIPO DE PROTECCION

- ❖ Guantes estériles.
- ❖ Gorro.
- ❖ Naso buco.
- ❖ Gabacha.



PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE VALORACION CILINDRO

PLACA O DIFUSIÓN EN AGAR:

1-Se prepararon cinco soluciones estándar (S1, S2, S3, S4, S5) donde S3 es la dosis media.

2-Se preparó un nivel de la muestra a una concentración igual que el nivel medio del estándar (S3=M3).

3-En este ensayo, se prepararon 15 placas para la línea dosis- respuesta y 3 para la muestra.
¹USP 32 (2009).

4- Se distribuyó sobre una superficie plana y a nivel, la cantidad de 21 ml del medio de cultivo en cada da placa, para cada capa base (estéril, fundido y mantenido a 50 C aproximadamente).

5- Se dejó las tapas de las cajas entreabiertas para evitar la acumulación de agua de condensación.

6-Se dejó reposar por 20 minutos para que el agar solidificara y se tapó bien las placas petri.¹USP 32 (2009).

7-Se preparó 100ml del medio de cultivo 11, para capa siembra (estéril, fundido y mantenido a 48-50 C) con la cantidad sugerida de la suspensión de microorganismos (0.03 ml).

8-Se agregó a cada caja conteniendo la capa base solidificada, 4 ml de capa siembra. Se extendió uniformemente y se dejó solidificar por 20 minutos.

9-En las cajas así preparadas, se colocaron 6 cilindros de acero inoxidable sobre la superficie inoculada desde una altura de 12 mm, utilizando una pinza ¹USP 32 (2009).



10-Se utilizaron un total de 18 placas, 3 para cada una de las soluciones de la curva, excepto para la concentración central o punto de referencia de la curva, esta se incluye en todas las placas. ¹USP 32 (2009).

11-Los cilindros se llenaron de manera alterna con la solución de dosis media y otra de dosis de prueba.

El método se realizó por triplicado.

- ❖ Tres cilindros con solución S1 y los otros tres con S3.
- ❖ Tres cilindros con solución S2 y los otros tres con S3.
- ❖ Tres cilindros con solución S4 y los otros tres con S3.
- ❖ Tres cilindros con solución S5 y los otros tres con S3.
- ❖ Tres cilindros con solución S3 y los otros tres con la muestra.¹USP 32 (2009).

12-Las placas se colocaron a una temperatura entre 36-37C por 30 minutos.

13-Se incubaron de 35-37C por 18-24 horas.

14-Transcurrido el tiempo de incubación se prosiguió a retirar los cilindros. Con ayuda de una pinza metálica estéril.

15-Después de retirar los cilindros, se midió y se registró el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento con una aproximación de 0,1 mm de la regla del lector de zona colocando la placa contraluz. ¹USP 32 (2009).

16- De esta manera se obtuvieron 36 zonas de inhibición para la concentración de la S3 y 9 zonas de inhibición para cada una de las otras 4 concentraciones de la curva (S1, S2, S4, S5). ¹USP 32 (2009).



17-La interpretación de los resultados se realizó por el método estadístico siendo las etapas:

- ❖ Preparación del inoculo.
- ❖ Preparación de la muestra y soluciones de referencia.
- ❖ Preparación de platos Petri.
- ❖ Incubación.
- ❖ Lectura de halos.
- ❖ Procesamiento de datos.

En el procesamiento de datos se promediaron los diámetros de las 9 zonas de inhibición correspondientes a cada una de las soluciones de trabajo, obteniéndose el promedio parcial de las S3 de las diluciones: S1, S2, S4, S5. Se promediaron también los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución de referencia (patrón o bien S3), obteniéndose su respuesta promedio total, este se consideró el diámetro correcto y por lo tanto se usó para corregir los diámetros.¹USP 32 (2009).

Cuando el promedio total es mayor que el promedio parcial se resta de aquel y la diferencia es el factor de corrección con signo positivo, cuando el valor promedio parcial resulta mayor que el valor promedio total la diferencia es el factor de corrección con signo negativo. ¹USP 32 (2009).



RESULTADOS



POTENCIA DE GENTAMICINA 20mg/1ml.

Concentraciones de las diluciones de trabajo vs medidas de halos mm.

S3(0.1)	S1 (0.06))	S3 (0.1)	S2 (0.08)	S3 (0.1)	S4 (0.12)	S3 (0.1)	S5 (0.1562)	S3(0.1)	Muestra(0.1)
22.2	19.3	22.4	21.3	22.2	22.4	22.0	23.0	22.0	22.4
22.2	20.2	22.2	21.2	22.2	22.4	22.0	23.2	22.0	23.0
22.4	19.4	22.3	21.0	22.0	22.2	22.2	23.0	22.2	22.4
22.1	20.4	21.4	20.4	22.0	22.3	22.3	23.4	22.3	23.3
22.3	20.0	22.4	21.0	22.3	22.2	22.3	22.4	22.3	22.3
22.1	19.0	22.3	19.0	21.4	22.4	21.4	22.3	21.0	22.4
22.3	20.1	22.2	20.1	21.4	22.4	21.4	22.3	21.4	23.0
21.4	20.1	22.4	21.1	22.1	22.3	22.1	23.2	21.4	23.2
22.1	19.2	22.3	19.2	22.1	22.4	22.1	23.0	22.0	23.2

TablaN°:1.Concentraciones de las diluciones de trabajo vs medidas de halos mm de inhibición del crecimiento microbiano. Triplicado



PROMEDIO DE LA SOLUCIÓN

MADRE (S3).

S3 (0.1)
22.2
22.2
22
22
22.3
21.4
21.4
22.1
22.1
22.4
22.2
22.3
21.4
22.4
22.3
22.2
22.4
22.3
22.2
22.2
22.4
22.1
22.3
22.1
22.3
21.4
22.1
22
22
22.2
22.3
22.3
21.4
21.4
22.1
22.1
22.0694444

Tabla N°:2.Promedio de las 36 S3.



PROMEDIO PARCIAL DE LAS MEDICIONES DE HALOS DE INHIBICION DE CADA UNA DE LAS DILUCIONES.

S3	S1	S3	S2	S3	S4	S3	S5	S3
22.122	19.744	22.211	20.477	21.966	22.333	21.977	22.866	21.844
22222	44444	11111	77778	66667	33333	77778	66667	44444

TablaN°:3.Promedio parcial de las mediciones de halos de inhibición de cada una de las diluciones.

FACTOR DE CORRECCION DE LA SOLUCIÓN MADRE.

S3	S3	S3	S3	S3
-0,05277778	-0,14166667	0,10277778	0,09166667	0,225

TablaN°:4.Factor de corrección de la solución madre.

PUNTOS CORREGIDOS DE LAS DILUCIONES DE TRABAJO.

S1	S2	S4	S5
19,6916667	20,3361111	22,4361111	22,9583333

TablaN°:5.Puntos corregidos de las S1-S5.



CONCENTRACIONES DE LAS DILUCIONES DE TRABAJO VS. MEDIDAS DE HALOS DE INHIBICIÓN.

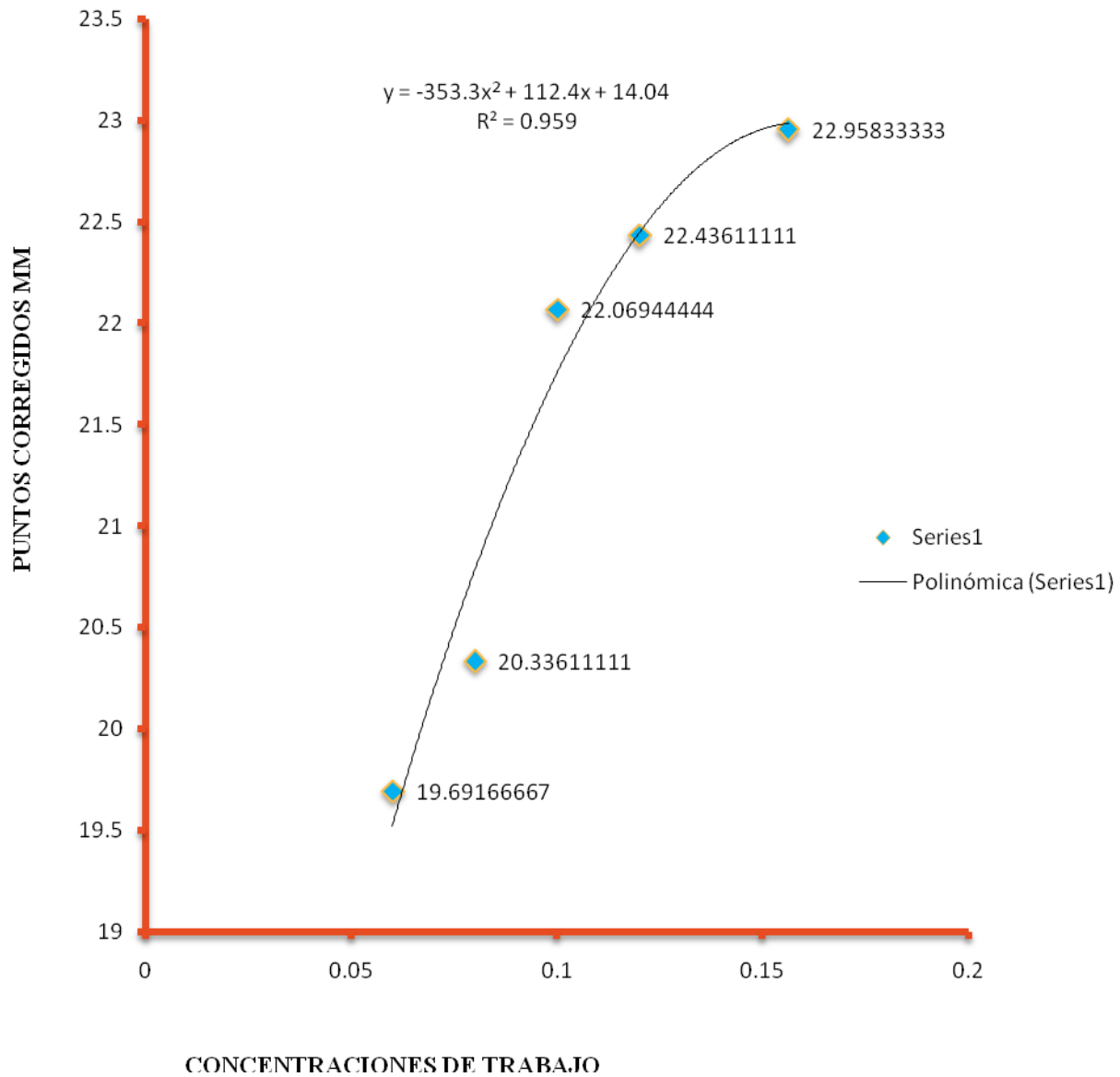
DILUCIONES	CONCENTRACIÓN	MM
S1	0,06	19,6916667
S2	0,08	20,3361111
S3	0,1	22,0694444
S4	0,12	22,4361111
S5	0,1562	22,9583333

TablaNº:6.Concentraciones de las diluciones de trabajo vs. Medidas de halos de inhibición del crecimiento.



LINEALIDAD

POTENCIA DE GENTAMICINA 20MG/1ML





REPETIBILIDAD

Potencia de Gentamicina 20mg/1ml. En este ensayo participaron 2 operadores y cada uno realiza todos los procedimientos involucrados y sus respectivas mediciones de halos de inhibición bacteriana.

S=0.32497863

Operador	D1	D2
O1	22.2	22.2
	22.2	22.2
	22	22.4
	22	22.1
	22.3	22.3
	21.4	22.1
	21.4	22.3
	22.1	21.4
	22.1	22.1
O2	22.4	22
	22.2	22
	22.3	22.2
	21.4	22.3
	22.4	22.3
	22.3	21.4
	22.2	21.4
	22.4	22.1
	22.3	22.1

TablaN°:7.REPETIBILIDAD.



**ANALISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES CON UNA SOLA MUESTRA
POR GRUPO.**

RESUMEN	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Fila 1	2	44.4	22.2	0
Fila 2	2	44.4	22.2	0
Fila 3	2	44.4	22.2	0.08
Fila 4	2	44.1	22.05	0.005
Fila 5	2	44.6	22.3	0
Fila 6	2	43.5	21.75	0.245
Fila 7	2	43.7	21.85	0.405
Fila 8	2	43.5	21.75	0.245
Fila 9	2	44.2	22.1	0
Fila 10	2	44.4	22.2	0.08
Fila 11	2	44.2	22.1	0.02
Fila 12	2	44.5	22.25	0.005
Fila 13	2	43.7	21.85	0.405
Fila 14	2	44.7	22.35	0.005
Fila 15	2	43.7	21.85	0.405
Fila 16	2	43.6	21.8	0.32
Fila 17	2	44.5	22.25	0.045
Fila 18	2	44.4	22.2	0.02
Columna 1	18	397.6	22.0888889	0.115163399
Columna 2	18	396.9	22.05	0.101470588

TablaN°:8 .ANÁLISIS DE VARIANZA.



ANÁLISIS DE VARIANZA.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Días	1.4113888 89	17	0.0830228 76	0.6213770 33	0.83209567	2.2718928 89
Operador	0.0136111 11	1	0.0136111 11	0.1018711 02	0.75348418 5	4.4513216 91
Repetibilidad	2.2738888 9	17	0.1336111 11			
Total	3.6963888 89	35				

TablaN°:9.ANÁLISIS DE VARIANZA.

Conclusión: Como F calculado es menor que F estadístico al 95% no hay diferencias significativas entre los días y entre los operadores.



Sr: 0.36552854

Varianza entre días $S^2_{d=}$	$(MC_d - MC_r) / ni$	0.06904189
Varianza (operador) $s^2_{op=}$	$(MC_{op} - MC_r) / ni$	-0.01333333
Precisión intermedia s_I	$(s^2_d + s^2_{op})^{1/2}$	0.23602661
Varianza Reproducibilidad $s^2_{R=}$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r$	0.18931967
Desviación Estándar de Reproducibilidad $(s_R)=$	$(s^2_d + s^2_{op} + s^2_r)^{1/2}$	0.4351088
$RSD_R\%$ o $CV_R\% =$	$s_R * 100 / \text{prom total}$	1.96980846
$RSD_r\%$ o $CV_r\% =$	$s_r * 100 / \text{prom total}$	1.65480726

Tabla N°:10. ANÁLISIS DE VARIANZA.



LA ESTIMACION DEL PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE GENTAMICINA SULFATO.

- ❖ Las unidades de trabajo fueron: ug/ml.
- ❖ La concentración de trabajo fue de: 0,1 ug /ml.

Porcentaje de actividad	Resultados obtenidos	% de potencia
$P=PMP*100/PST$	$P=22,8mm*100\%/22,6mm$	103,35

TablaN°:11.ESTIMACION DEL % DE ACTIVIDAD.

Considerando a 22.8 mm (Promedio de inhibición de halos de la muestra) y del Standard como 100% de actividad, 22.06 mm (Promedio de inhibición de halos del Standard).



MEDIDAS DE LOS HALOS DE INHIBICION DE LA MUESTRA DE GENTAMICINA EN AMPOLLA DE 20 MG /1 ML.

Muestra(0.1)
22.4
23.0
22.4
23.3
22.3
22.4
23.0
23.2
23.2
Promedio:
22,8

TablaN°:12. Promedio de la medición de los halos de inhibición de la muestra.



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS



Para la valoración de la potencia microbiológica de la Gentamicina se utilizó el método de Cilindro-Placa, empleando la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228. Evaluando la influencia de la *S.epidermidis* sobre la actividad antimicrobiana del sulfato de Gentamicina. Tanto para la muestra como para la sustancia de referencia de Gentamicina. El incremento de la concentración de Gentamicina provocó un aumento en los diámetros medidos mostrando una buena correlación al lograr valores de $r_2 \geq 0.959$.

En la Tabla N° 1 se indican las concentraciones de las diluciones de trabajo vs medidas de halos mm de inhibición del crecimiento microbiano.

En la tabla N°2 se ilustra el promedio de los diámetros de las 36 zonas de inhibición de la solución madre. También se promedió el diámetro de las 9 zonas de inhibición correspondientes a cada una de las diluciones de trabajo, Tabla N°3. La curva estándar de mejor ajuste de los puntos corregidos, contra las concentraciones de trabajo mostró una adecuada proporción lineal entre ambas variables que se muestran en la Tabla N° 5 y 6. La repetibilidad del método se realizó por medio de 2 analista en el mismo laboratorio y en diferentes días los datos obtenidos demuestran que no hay variación entre los resultados o halos de inhibición del crecimiento microbiano ya que un 95% del F estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los días y entre los operadores. Tabla N° 7, 8, 9, 10. En la Tabla N° 11 se indica el porcentaje (%) de actividad de gentamicina sulfato. La estimación del porcentaje de actividad se obtuvo comparando los resultados de las mediciones de los halos de inhibición del estándar y la muestra. la determinación de la potencia de gentamicina sulfato, se utilizó un volumen cuidadosamente medido de gentamicina y del solvente apropiado luego se realizaron las demás diluciones con la solución buffer indicada, hasta llegar a obtener las concentraciones deseadas, para realizar la prueba microbiológica por el método cilindro –placa. La muestra de gentamicina se analizó, y diluyó en similares condiciones al Standard hasta llegar a una concentración (0,1 ug/ml) que de acuerdo a la información disponible sería igual que la concentración del Standard o patrón. Sólo esta concentración se requirió para el ensayo en la curva estándar. En la Tabla N°:12 se ilustra el Promedio de las mediciones de los halos de inhibición de la muestra.



CONCLUSIONES



Se validó la técnica propuesta para la valoración de muestras comerciales de Gentamicina, estableciendo los factores críticos propios del ensayo como el pH de las soluciones y del medio, el tiempo de lectura o incubación, y las otras características de la validación como la determinación de la linealidad, precisión (repetibilidad).

Se obtuvieron halos muy reproducibles, con bordes bien definidos y buen contraste entre las zonas de inhibición y crecimiento lo que da seguridad de la precisión de los diámetros de la zona de inhibición sabiendo que no hay diferencias significativas entre días y analistas. Los resultados en los halos de inhibición del crecimiento fueron obtenidos por la acción de la Gentamicina. El método analítico validado demostró ser específico pues se observaron halos de inhibición tanto para la SRF como para la muestra.

Con este bioensayo se demostró que la potencia de la muestra farmacéutica es equivalente a la potencia de la SRF, adicionalmente se corroboró que el contenido de activo está dentro del rango especificado por la monografía.

La potencia de la Gentamicina (0.1 µg) en ampolla de 20 mg/1ml está relacionada con la inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba, *staphylococcus epidermidis*.



RECOMENDACIONES



- ❖ Mantener iguales las condiciones de los ensayos es fundamental para poder hacer la validación microbiológica.

- ❖ Optimizar los factores imprescindibles como concentración de los estándares y la muestra, cantidad de inóculo, estandarización de la solución de inóculo, pH del buffer, temperatura o tiempo de incubación para garantizar la eficacia del método microbiológico.

- ❖ El volumen y la temperatura del agar debe mantenerse constante, al momento de la aplicación en las cajas de Petri.

- ❖ El tiempo de predifusión es muy importante, pues es donde el activo alcanza la difusión adecuada, sin estar en incubación.

- ❖ Realizar con extremo cuidado las lecturas de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano ya que este es indispensable para la interpretación de los datos.

- ❖ Cabe destacar que si bien este ensayo no es muy complicado en cuanto a técnica una vez validada la metodología, sí requiere de muchísimo tiempo pues es una labor de cuidado principalmente para la preparación de las soluciones y las mediciones.



BIBLIOGRAFIA



❖ **LIBROS:**

- 1-USP 32 (2009). Farmacopea de los estados unidos Mexicanos.Cap.81. NF 27. VOL. 1.
- 2-Monografía de Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (AEFI). Marzo 2001.Validación de Métodos Analíticos.
- 3-Monografía Gallardo Bravo F.R.(2002). Validación de un método de análisis cuantitativo: sulfato de gentamicina 80mg/2ml.

❖ **DICCIONARIO :**

- 4-Diccionario de especialidades farmacéuticas (PLM) 13ª edición C.A.D (1981).

❖ **INTERNET:**

- 5- GARCIA APAC C. (2003). Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso.

Disponible en internet:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2003000400012&script=sci_arttext.

- 6-Mallen Ramírez, Mª.M. (2009).Resistencias a nuevos antimicrobianos en patrones sépticos. Universidad complutense de Madrid.

Disponible en internet:pendientedemigracion.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t25509.pd.



7-Mejía Rangel, L.S, (n.d).Validación de la técnica para la cuantificación de tilosina en un producto sólido. Pontificia Universidad Javeriana.

Disponible en internet:

www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis150.pdf.

8-Palomino, J. (2003).AMINOGLUCÓSIDOS. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. España.

Disponible en internet:

http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/eimc_docs/28v21n02a13042869pdf001.pdf

9-Pedraza Arias, P.N y Castellanos Rivera H.J (2009).Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través del método in vitro. Pontificia universidad Javeriana.

Disponible: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis326.pdf>

10-Velandia castellano, JC. (2011). Validación del Método Analítico para la cuantificación de Bacitracina. Pontificia Universidad Javeriana.

Disponible en internet:

www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis126.pdf

http://en.citizendium.org/wiki/micrococcus_luteus (03/12/2010)2013.



ANEXOS

ANEXOS



Tabla 1. Organismos de prueba para antibióticos valorados según el procedimiento indicado.

- ❖ Determinar la concentración que proporcione zonas de inhibiciones bien definidas y medibles.
- ❖ Número de identificación en la American Type Culture Collection (Colección de Cultivos Tipo de los EE.UU.)

Número ATCC	Microorganismo de prueba	Método	Medio utilizado		Periodo de incubación	Factor de dilución	Periodo de almacenamiento sugerido en refrigeración
			Mantenimiento	Suspensión de prueba			
29737	A) <i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	24	1:20	1 semana
9341	C) <i>Micrococcus luteus</i>	1	11	1	24	1:25	2 semanas
12228	D) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1	1	24	1:14	1 semana
9763	E) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	19	19	48	1:30	4 semanas
4617	F) <i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	1	1	24	1:20	2 semanas
6633	H) <i>Bacillus subtilis</i>	1 2	1 1	1 32	24 5d	❖	6 meses 6 meses
10031	I) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	1	24	1:25	1 semana
10536	J) <i>Escherichia coli</i>	1	1	1	24	1:20	2 semanas
-	K) <i>Streptococcus faecium</i>	5	--	--	--	--	24 horas
10240	L) <i>Micrococcus luteus</i>	1	1	1	24	1:35	4 semanas
-	M) <i>Microsporium gypseum</i>	4	--	--	--	--	2 meses
9763	T) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	19	19	48	1:30	4 semanas
25619	W) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1	24	1:25	2 semanas
607	X) <i>Micobacterium smegmatis</i>	8	36	36	❖	--	2 semanas



Tabla 2: Cilindro-Placa (Difusión en Agar)

- ❖ Determinar la cantidad del inóculo por pruebas en placas.
- ❖ Usar la dilución de la suspensión que del 25 % de transmitancia, en el lugar de la suspensión cosechada.

Antibiótico	Medio		MI de medio en		Organismo de prueba	Volumen de inóculo sugerido estandarizado por 100ml de medio(ml)	Tiempo de incubación de las placas (C)
	Capa base	Capa siembra	Capa base	Capa siembra			
Anfotericina B	--	19	--	8	E	1.0	29-31
Ampicilina	11	11	21	4	C	0.5	32-35
Bacitracina	2	1	21	4	L	0.3	32-35
Bleomicina	35	35	10	6	X	1.0	32-35
Carbenicilina	2	1	21	4	W	(2)0.5	36-37.5
Dactinomicina	5	5	10	4	H	(1)	36-37.5
Dicloxacilina	2	1	21	4	A	0.1	32-35
Eritromicina	11	11	21	4	M	1.5	32-35
Gentamicina	11	11	21	4	D	0.03	36-37.5
Griseofulvina	20	21	6	4	M	(1)	30(48 H)
Kanamicina B	5	5	21	4	H	(1)	36-37.5
Mitomicina	8	8	10	4	H	0.5	36-37.5
Neomicina	11	11	21	4	A	0.2	32-35
Nistatine	--	19	--	8	T	1.0	29-31
Penicilina G	2	1	21	4	A	1.0	32-35
Polimixina B	9	10	21	4	F	0.1	36-37.5
Rifampicina	2	2	21	4	H	0.1	29-31

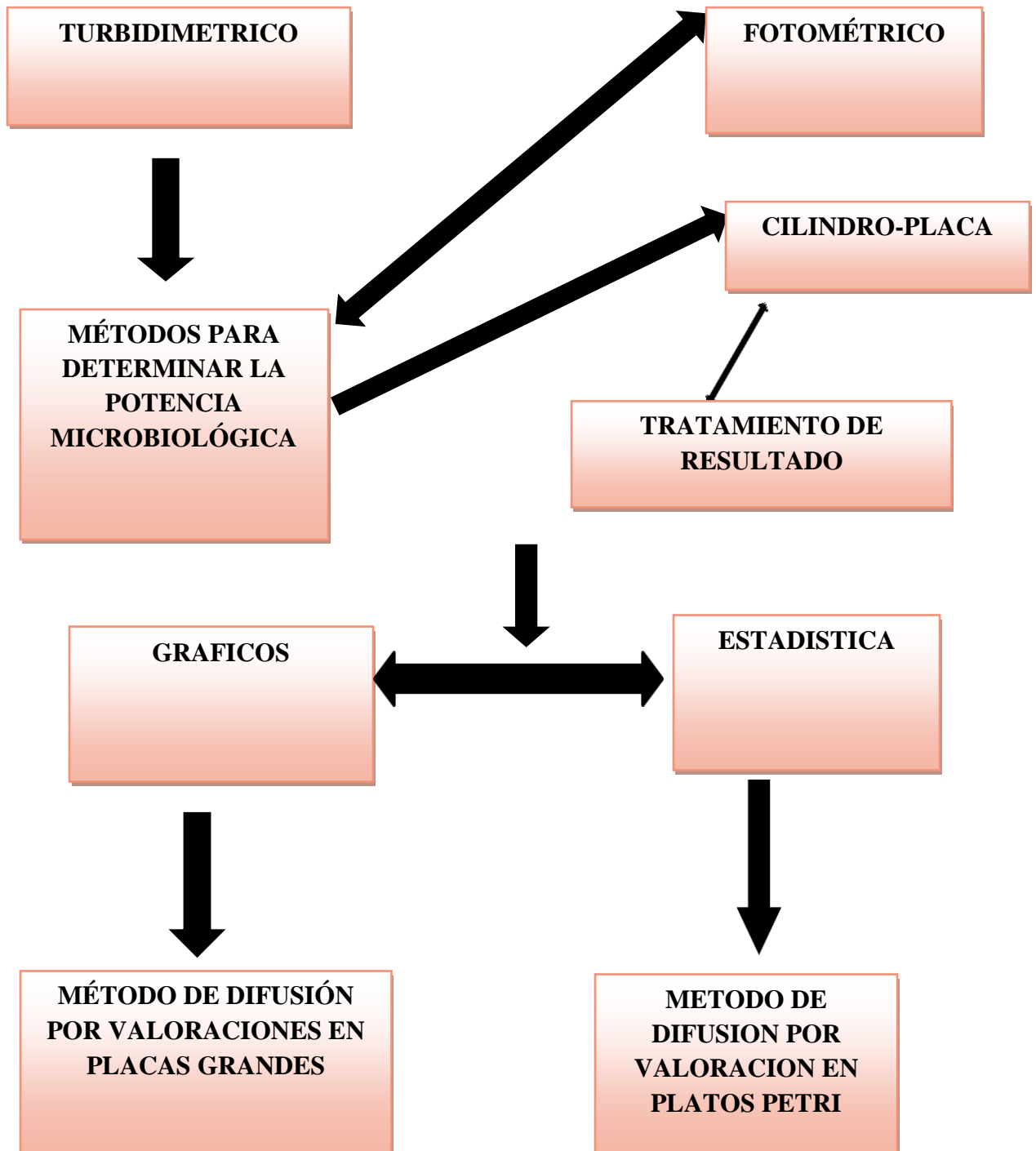


Tabla 3. Preparación de Soluciones Madre y Diluciones de Prueba de Estándares de Referencia.

Antibiótico y tipo de valoración (cilindro-placa (CP) o Turbidimétrica (T).	Secado	Solvente inicial	Diluyente inicial	Solución madre final Concentración/ ml	Almacenamiento en refrigeración	Diluyente final	Dosis activa en mcg o U/ml	Factores de dilución
Anfotericina B (CP)	1	--	Dimetilsulfoxido	1mg(1)	Usar el mismo día	10	1.0u g	1.25
Ampicilina	No	--	Agua destilada	1mg	1 semana	3	0.1u g	1.25
Bacitracina(CP)	1	--	HCL 0.01N	100u	Usar el mismo día	1	1.0U	1.25
Bleomicina(CP)	7	--	16	2u	2 semanas	16	.04U	2.0
Carbenicilina (CP)	No	--	1	1mg	2 semanas	1	20.0 ug	1.25
Dactinomicina	1	10000mcg/ml en alcohol metílico	3	1mg	3 meses	3	1.0u g	1.41
Dicloxacilina	No	--	1	1mg	7 días	1	5.0u g	1.25
Eritromicina(CP)	1	10000mcg/ml en alcohol metílico	B.3	1mg	14días	B.3	1.0u g	1.25
Gentamicina(CP)	3	--	3	1mg	1 mes	3	1.0u g	1.25
Griseofulvina	No	--	Dimetilformamida	1mg(4)	3 meses	3	5.0u g	1.25
Kanamicina B (T)	No	--	3	1mg	1mes	3	1.0u g	1.25
Mitomicina	No	--	1	1mg	14 días	1	1.0u g	1.25
Neomicina(CP)	1	--	3	1mg	2 semanas	3	1.0u g	1.25
Nistatine(CP)	4	--	Alcohol metílico	1000u(2)	Usar el mismo día	6	20.0 U	1.25
Penicilina G(CP)	No	--	1	1000u	4 días	1	1.0U	1.25
Polimixina B(CP)	1	Agua destilada (3)	6	10000u	2 semanas	6	10.0 U	1.25
Rifampicina	1	--	Alcohol metílico	1mg	1día.	1	5.0u g	1.25



❖ **MÉTODOS PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE ANTIBIÓTICOS**





Imágenes en el laboratorio de control microbiológico de la facultad de ciencias químicas de la UNAN-León, durante el desarrollo del ensayo de potencia de Gentamicina en Ampolla de 20mg/1ml.



Área de Lavado de cristalería.



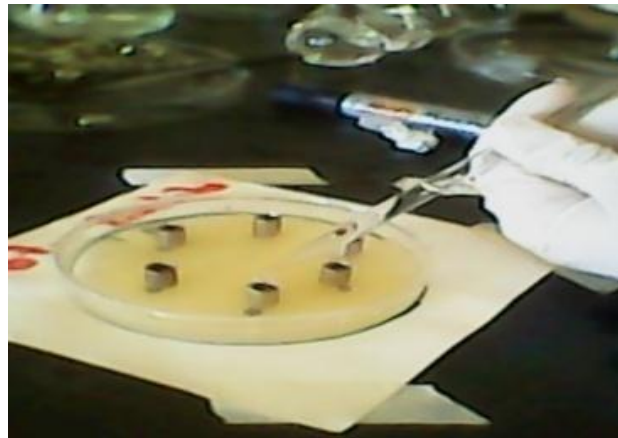
Esterilización de la cristalería, utilizando la autoclave.



Preparación de las suspensiones.



Medios de cultivos, preparados.

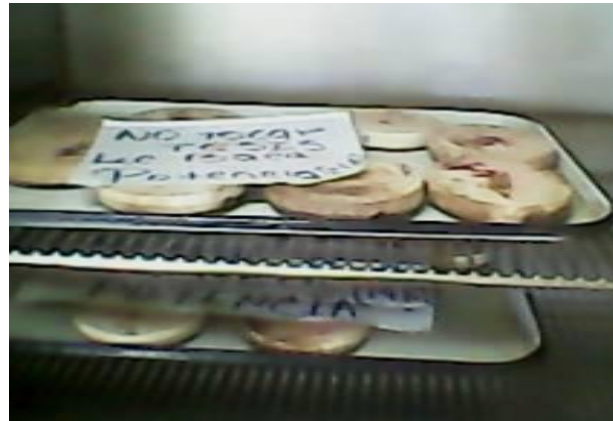


Adicionando soluciones S1, S2, S3, S4, S5, M. a los cilindros metálicos colocados en la placa petri, conteniendo medio de cultivo con su respectivo medio de siembra. Previamente elaborados.





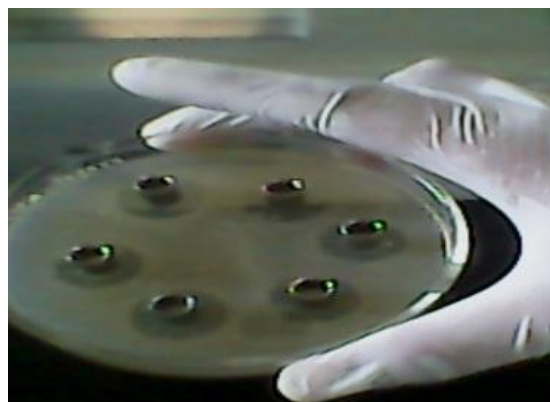
Colocando la tapa a la placa petri.

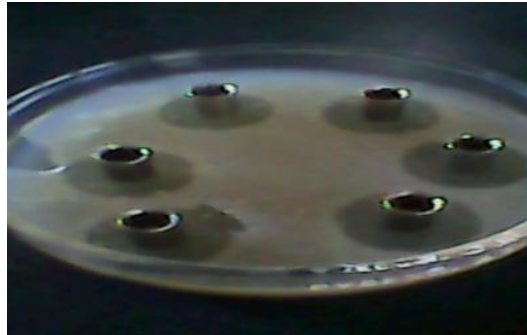


Incubación de las placas petri.



Se destapan las placas petri, luego de transcurrido el tiempo de incubación.

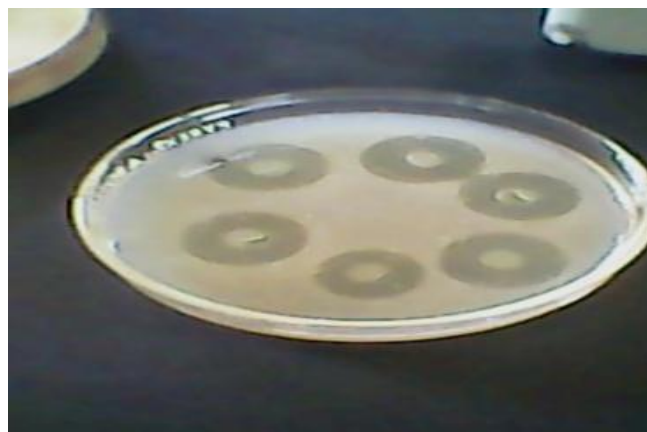




Placa petri completamente destapada, se observa claramente la formación de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.



Los cilindros metálicos fueron retirados de las placas petri con una pinza.



Se observan claramente los halos de inhibición del crecimiento microbiano.



Se procedió a la lectura del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento microbiano.



En la lectura del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento microbiano utilizando el lector zona.