

*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA DE FARMACIA*



Monografía para optar al título de Licenciado Químico- Farmacéutico

Validación del método para cuantificar Staphylococcus aureus en jarabe de Piperazina en el laboratorio de control microbiológico. Facultad de CC QQ, UNAN-LEON

Autores:

- *Br. Ana Leticia Machado Reyes*
- *Br. Jael Ignacia Duarte Báez*
- *Br. Marisela del Socorro Chavarría Rodríguez*

Tutor:

Msc. Fernando Emilio Baca Escoto

*León, Nicaragua
Junio 2009*



AGRADECIMIENTO:

A Dios:

Ser supremo y arquitecto creador de mi existencia, quien a estado pendiente de mi, cada momento, cada día, brindándome sus misericordia y prestándome tanto la vida como la disposición para culminar mi carrera.

Gracias por darme a esos padres maravillosos que se esforzaron para ayudarme a escalar la cima

Por todo y todo!!!
Gracias Dios mío!

Jael Ignacia Duarte Báez



DEDICATORIA:

A mis padres:

Flor de luz de nuevos esplendores, dones del cielo y de la tierra, que con cariño me han apoyado en todo lo necesario, con grandes esfuerzos e innumerables sacrificios han luchado para darme lo mejor, perseverando diario para hacer de mi una persona útil y digna a la sociedad,

Quiero ser reflejo de su valor y su cariño, pido a Dios me los guarde para siempre.

A mis hermanos:

Que juntos me apoyaron hasta el fin de mi carrera dándome ánimo para no caer vencida ante tantos retos, desafíos y confusiones que surgieron. Siempre habrá en mi recuerdo y en mi corazón lugar para ellos quienes estuvieron muy cerca.

Jael Ignacia Duarte Báez



AGRADECIMIENTO:

Al haber realizado este trabajo monográfico me siento agradecida principalmente con **Dios**, fuente de amor, sabiduría y entendimiento y por permitirme a **mis padres**, que me ayudaron a terminar mi carrera brindándome su apoyo y dedicación hasta haber logrado esta meta que nos habíamos propuesto; gracias a Dios hoy nuestros sueños son realidad, a **mi hermana** porque su ayuda fue trascendental para la realización de esta monografía.

Un agradecimiento especial al Msc. Fernando Baca, por habernos apoyado y dirigido pues con su ayuda logramos realizar este trabajo

Ana Leticia Machado Reyes



DEDICATORIA:

Dedico esta monografía a:

Dios, creador de nuestros sueños y esperanzas

Mis padres, dones del cielo y de la tierra

Mi hermana, sangre compartida

Mis amigos, ecos del alma y del corazón

Ana Leticia Machado Reyes



AGRADECIMIENTO

A:

DIOS...

Por ser el encargado de toda la gracia, dicha y felicidad por la que estoy pasando, pero la más importante de todas es permitir que llegara a culminar mis metas. Él es el único que siempre estuvo a mi lado y sabia por todo lo que había pasado, principalmente las dificultades para poder llegar a realizar mi sueño y gracias a él lo logre, saliendo adelante para lograr un buen desempeño como profesional.

MI ESPOSO...

Por estar conmigo en los momentos mas difíciles de mi vida, por brindarme su apoyo incondicional en lo que he necesitado hasta el momento y sobre todo darme fuerzas y animo para salir adelante, de corazón le agradezco todo lo bueno que me ha enseñado, TE AMO Danilo Rentería.

Maricela Chavarría Rodríguez



DEDICATORIA

A:

MIS PADRES...

Esta etapa de mi vida, ha sido una de las más satisfactorias e importantes, pero lo que lo hace especial es que llegué al final, con la ayuda de dos seres maravillosos y gracias al cariño de muchas personas y con mi esfuerzo mismo. Diosito me premio en mandarme a este mundo y tener unos padres ejemplares, que con la labor y el desempeño de ellos supieron criarme y sobre todo darme muchísimo amor, ayudándome en todas las dificultades que tuve, aún con mis altos y bajos. Siempre estuvieron ahí, dándome ánimo y consejos para vencer los obstáculos presentados en el camino, pero gracias a ellos que nunca me abandonaron les agradezco de lo mas profundo de mi corazón en haber sido ambos mi guía por eso les dedico con mucho amor este trabajo y darles gracias infinitas, ya que por ellos estoy en donde estoy y soy lo que soy. Victorino Chavarría Sequeira (papi) y Maritza Rodríguez García (mami) los amo y adoro por ser el regalo mas bello que Diosito me dió... Tenerlos como mis padres.

Dios los guarde y los bendiga siempre..!

MAMITA SOFIA...

Realizar esto y tener tanta alegría, no será lo mismo sin tu presencia, perderte fue lo mas duro que he pasado, porque fuiste y serás siempre alguien muy especial en mi vida, siempre te dije lo importante que iba a ser tu presencia en esta etapa de mi vida, sé que Diosito te llamo y que estuve muy mal por tu partida que llegue a reprocharle el porqué te había apartado de mi, pero entendí que esa es la ley de la vida, ahora le doy gracias porque se que ya no estas sufriendo con tu dolor y sé que estas mucho mejor al lado de él, te extraño tanto porque me da mucha tristeza que no estés a mi lado, escuchar tus consejos, contarte todo lo que me pasaba, verte sonreír y felicitarme cuando te sentías orgullosa de mi, por eso te dedico este pequeño trabajo y lo mas importante el saber que en donde quieras que estés, te recordaré el resto de mi vida.

TE QUIERO MITA...!



MI BEBE...

Tenerte dentro de mi, es lo mas maravilloso que me ha pasado como mujer, llegas a mi vida y me lleno de alegría y felicidad el saber que dentro de pocos meses te podre tener entre mis brazos y abrazarte, besarte y colmarte de mucho amor, eres lo mejor que me ha pasado y todo esto lo hago por un futuro próximo en nuestras nuevas vidas para darte un bienestar y decirte que te he amado desde mucho antes y ahora te adoro con toda mi alma aunque todavía no hayas nacido, pero te tengo dentro de mi vientre y eso te hace muy especial para mi .

TE AMO BEBE!

Maricela Chavarría Rodríguez



INDICE

Introducción	-----	10
Objetivos	-----	12
Marco teórico	-----	13
Procedimiento	-----	26
Diseño metodológico	-----	28
Resultados	-----	29
Análisis de resultados	-----	36
Conclusiones	-----	37
Recomendaciones	-----	38
Glosario	-----	39
Bibliografía	-----	41
Anexos	-----	42



INTRODUCCION

La industria farmacéutica requiere de mayores exigencias en el control de calidad de los medicamentos debido al incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que necesitan de métodos de análisis convenientes que proporcionen resultados de gran confiabilidad. Es por ello que se realiza la validación de los métodos de análisis en microbiología para respaldar por estudios de laboratorio la capacidad y la calidad del método, demostrando su funcionalidad y proporcionando la evidencia documentada del procedimiento, el tratamiento estadístico apropiado y un criterio de aceptación.

La validación de un proceso es un programa que debe incluir evidencia documentada de la aptitud de los materiales, del funcionamiento y confiabilidad del equipo y de los sistemas de la adecuación de las instalaciones y de la competencia del personal que proporciona procesos seguros y confiables, al mismo tiempo interpretar adecuadamente los datos recogidos en suficiente número de ensayos para obtener una medida estadística válida.

La validación de los métodos de control microbiológico persigue los mismos objetivos que la validación química y, en este sentido, existe un paralelismo evidente. El trabajo en microbiología, sin embargo, tiene algunas peculiaridades, existen instrumentos y equipos característicos (autoclaves, hornos, estufas de cultivo, sistemas de filtración, equipos para identificación de microorganismos, cabinas de seguridad, etc.), y reactivos y materiales (medios de cultivo, diluyentes, cepas control, filtros, etc.) propios del entorno microbiológico que requieren la aplicación de los principios de las BPL. La obtención de resultados seguros y fiables depende en gran medida de la correcta aplicación de las BPL en el ámbito microbiológico.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP 24 <1225>) indica que cuando se usan métodos de farmacopea no se debe validar la exactitud ni la precisión pero si verificar su idoneidad en las condiciones reales de uso. También (USP 24 <1227>) hace referencias a las validaciones de la recuperación microbiana, de la detección de microorganismos específicos, del ensayo de eficacia de conservadores y del ensayo de esterilidad.



En años anteriores no se han abordado estudios acerca de validación de la determinación de staphylococcus aureus en jarabe, por lo que en la Facultad de Ciencias Químicas no existe información suficiente respecto al tema.

Es por esta razón que en nuestro trabajo monográfico realizamos la validación del método de determinación de Staphylococcus aureus en jarabe de piperazina.

Pretendemos determinar si los resultados obtenidos son confiables para las aplicaciones futuras y finalmente dejar un aporte bibliográfico que sirva de apoyo para obtener información y conocimientos necesarios para la validación de métodos de análisis en microbiología.



OBJETIVOS

Objetivo general:

- Validar la determinación cuantitativa de staphylococcus aureus en jarabe de piperazina en el laboratorio de control microbiológico de la UNAN-LEON.

Objetivo específico:

- Determinar la exactitud del ensayo en la cuantificación de staphylococcus aureus en jarabe de piperazina
- Determinar la precisión del ensayo en la cuantificación de staphylococcus aureus en jarabe de piperazina



MARCO TEORICO

1. Microbiología

La Microbiología se puede definir, sobre la base de su etimología, como la ciencia que trata de los seres vivos muy pequeños, concretamente de aquellos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano. Esto hace que el objeto de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia, y poder estudiar, a los microorganismos. Precisamente, el origen tardío de la Microbiología con relación a otras ciencias biológicas, y el reconocimiento de las múltiples actividades desplegadas por los microorganismos, hay que atribuirlos a la carencia, durante mucho tiempo, de los instrumentos y técnicas pertinentes.

2. *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* comprende microorganismos que están presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves, incluyendo a 35 especies y 17 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en los humanos. Las especies que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en humanos son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus haemolyticus*

Staphylococcus aureus (estafilococo áureo) es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forunculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis.

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.



2.1 Clasificación científica

Reino: Bacteria
Filo: Firmicutes
Clase: Bacilli
Orden: Bacillales
Familia: Staphylococcaceae
Género: *Staphylococcus*
Especie: *S. aureus*

Nombre binomial: *Staphylococcus aureus*

2.2 Morfología

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una capsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismos grampositivo, pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.

La morfología de esta bacteria se caracteriza por:

- colonias lisas, brillantes y convexas.
- poseer un endopigmento color amarillo-naranja a blanco porcelana color dorado “aureus”
- fermenta glucosa, lactosa y maltosa
- el crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura 6.5° a 50° C, siendo optimo 30° - 40° C



3. Validación

La validación es un proceso por el que se comprueba que un procedimiento proporciona resultados aceptables.

Es establecer mediante evidencia documental, con un alto grado de seguridad, que mediante un proceso específico se obtendrá un producto que cumple con las especificaciones y atributos de calidad previamente determinados

La validación garantiza que el procedimiento escrito es lo suficientemente detallado como para que distintos analistas o laboratorios obtengan resultados comparables cuando lo utilicen.

Los métodos susceptibles de ser validados se clasifican en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica
- Ensayos para la determinación de características fármaco técnicas inherentes
- Ensayo de limite de impurezas y de cuantificación de impurezas
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales
- **Ensayos microbiológicos**

3.1 Validación de métodos de análisis en microbiología

La validación de los métodos de control microbiológico persigue los mismos objetivos que la validación química y, en este sentido, existe un paralelismo evidente.

La puesta en marcha de un procedimiento de análisis, ya sea químico o microbiológico, consta de tres etapas sucesivas y bien definidas: fase de desarrollo y prevalidación, fase de validación y fase de aplicación de rutina.



La primera fase debe tener en cuenta una serie de consideraciones de tipo metodológico y práctico:

- Instrumentación a utilizar
- Microorganismos
- Tiempo (período de incubación, tiempo de análisis requerido)
- Coste
- Seguridad e implicaciones medioambientales
- Robustez del método

Una vez desarrollado el método debe prepararse el protocolo de validación. Al no existir pautas oficiales de validación, el trabajo a efectuar depende de la experiencia y estrategia de cada laboratorio. Los protocolos de validación deben permitir rentabilizar los ensayos efectuados y extraer la misma información e interpretación de los resultados obtenidos.

Ensayos microbiológicos que requieren validación

- Ensayos de límites microbianos
- Recuento microbiano
- Ensayo de esterilidad
- Ensayo de eficacia de preservativo
- Programa de control de ambiente
- Ensayos biológicos



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

La exactitud se definirá como porcentaje de recuperación frente al valor del inoculo

La precisión es la medida de error indeterminado del método. Debido a la mayor variabilidad de los sistemas microbiológicos, los límites aplicables a la exactitud y precisión son mucho más amplios.

Referente al resto de parámetros de validación, la selectividad requiere menos demostración por cuanto se utilizan habitualmente medios selectivos para los microorganismos.

La linealidad se debe determinar en el caso de valoraciones de antibióticos y requiere la utilización de logaritmos de las concentraciones para obtener regresiones lineales

Los límites de detección y cuantificación están implícitos y no precisan por lo general de una determinación especial.

3.2 Cepas control

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

Las farmacopeas aconsejan para los distintos ensayos, cepas determinadas,



USP 24	Farmacopea Europea 3ª edición
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Staphylococcus aureus ATCC 6538 o ATCC 6538P
Escherichia coli ATCC 8739	Escherichia coli ATCC 8739
Pseudomona aeruginosa ATCC 9027	Pseudomona aeruginosa ATCC 9027
Salmonella. Sp	Salmonella abony NCTC 6017
Bacillus subtilis ATCC 6633	Bacillus subtilis ATCC 6633 (suspensión se esporas)
Clostridium sporogenes ATCC 11437	Clostridium sporogenes ATCC 17404
Micrococcus luteus ATCC 9341	
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	
Candida albicans ATCC 10231	Candida albicans ATCC 2091 o 10231
Aspergullus niger ATCC 16404	Aspergullus niger ATCC 16404
	Clostridium perfringens ATCC 13124
	Zygosacchamycetes rouxii NCYC 381

Las cepas de microorganismos deben tener un origen e identidad conocida así como una estabilidad bioquímica que minimice 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

Según se indica en Farmacopea Europea y en USP el cultivo de un microorganismo que se vaya a utilizar como inóculo en una validación debe proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original

3.2.1 Conservación

La conservación se puede efectuar por congelación o por liofilización. El método de liofilización consiste en inocular el microorganismo en un medio



crioprotector, hacer una congelación rápida con nitrógeno líquido y después pasarlo al liofilizador.

3.2.1.1 Congelación de Microorganismos

3.2.1.1.1 Medios de congelación

Para la congelación se utilizan medios crioprotectores:

- Caldo de TSB mas un 10-15% de glicerol.
- Caldo infusión corazón-cerebro mas un 10-15 % de glicerol.
- Medio selectivo adecuado mas un 10-15 % de glicerol.

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

3.2.1.1.2 Método

Se toman cuatro o cinco colonias (o más según el tamaño) del aislamiento y se suspenden en uno de los caldos crioprotectores. Se dejan en incubación durante 24 horas entre 30°-35 °C o en las condiciones más idóneas para el crecimiento del microorganismo y posteriormente se congelan entre -15 y -50°C.

Se preparan suficientes viales para disponer de una fuente cepas patrón durante el tiempo en que se compruebe la viabilidad del microorganismo o como máximo un año. Cuando sea necesario se extrae el vial del congelador y se descongela sumergiéndolo en baño de agua a unos 40°- 45°C, agitando. La suspensión que no se emplee debe desecharse y nunca recongelarse. También puede sembrarse en medio líquido o sólido “rascando” parte del congelado y devolviendo el vial al congelador. En el caso de los viales con bolitas se toman una o dos bolitas y se inoculan en un medio sólido o líquido, procediendo a la incubación en las condiciones adecuadas para el microorganismo. El cultivo obtenido por uno de estos procedimientos será el cultivo primario del trabajo.



3.2.1.1.3 cultivos de trabajo

A partir del cultivo primario pueden realizarse 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 cinco pases desde la cepa original.

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.

3.3 Medios de cultivo

Antes de afrontar la validación de un método microbiológico se debe tener en cuenta la seguridad de que los medios de cultivo que se van a utilizar tienen la calidad adecuada. Esta calidad viene dada por sus propiedades nutritivas y selectivas

3.4 Diluyentes

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

USP 24	Farmacopea Europea 3ª edición
	Solución peptonada con tampón de fosfatos y cloruro sódico pH 7.0
	Solución peptonada con tampón de fosfatos y cloruro sódico y polisorbato 80(0.1%, 1%) pH 7.0
Caldo lactosado	Caldo lactosado
Caldo con peptonas de caseína y soja-TSB	Caldo con peptonas de caseína y soja-TSB
Solución tampón de fosfatos pH 7.2	
Caldo con peptonas de caseína y soja, lecitina (0.5%) y polisorbato 20 (4%)	



3.5 Suspensiones normalizadas o estandarizadas

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de 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 debemos tener un sistema para asegurar el número aproximado de microorganismos que tenemos en una suspensión sin tener que esperar a los resultados de un recuento (mínimo 24 horas de espera) ni trabajar a ciegas.

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 a una longitud de onda determinada, tendremos el mismo número de microorganismos.

3.6 Grado de contaminación microbiana

3.6.1 Recuperación microbiana

El ensayo de grado de contaminación en productos no estériles está descrito en Farmacopea Europea y en USP 24.

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. 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.



3.6.2 Exactitud y precisión:

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%)

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
- Baja recuperación para todos los microorganismos. Debemos cuestionar el método y en lo posible modificarlo para incrementar el nivel de recuperación
- Baja recuperación para uno de los microorganismos y dentro de los límites para todos los demás.
- 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 posibles contaminaciones

Precisión:

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



3.7 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*.

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: la incertidumbre del inóculo volumen, al azar debido a la dispersión de partículas estadísticas, y la incertidumbre de la lectura del resultado.

La incertidumbre de dilución es con frecuencia un cuarto factor. La guía ISO incertidumbre (Anon. 1995) clasifica los métodos de estimación de la incertidumbre en dos tipos de llamada de tipo A y tipo B de evaluación (de la incertidumbre).

3.7.1 Tipo A de la evaluación:

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).

3.7.2 Evaluación de tipo B (de 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.

3.7.3 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 repetibilidad y reproducibilidad parámetros (precisión de las estimaciones), determinado en método de colaboración rendimiento estudios.

Existen razones por las cuales este enfoque es probable que ser menos éxito en la microbiología. Uno de ellos es la colonia impredecible número que varía de caso a caso y por lo general es la principal causa de la incertidumbre. 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. Un procedimiento matemático, llamada 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 las más importantes componentes de la incertidumbre del proceso analítico, teniendo cuidado de evitar "doublecounting", es decir, incluida cualquier incertidumbre componente más de una vez. Encontrar un valor para por cada uno de los componentes de tipo **A** o tipo **B** y la combinación de procesos que hace matemáticamente. Es posible componer una estimación de la incertidumbre de la medición de cualquier situación excepcional.



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, posiblemente llevado a cabo para completamente otros fines, pueden ser fuentes adecuadas de información sobre la variabilidad de la prueba resultados.

3.7.4 Fuentes de información

Cuando sea necesario, otros medios de estimación se utilizan. Los medios incluyen asumió estadística distribuciones (Poisson, binomial) o supone a priori la distribución de posibles valores (rectangulares y triangulares las distribuciones). 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.

3.7.5 Formas de evaluar la incertidumbre (u_i)

A. Por los métodos estadísticos: Evaluación de la desviación estándar a partir de una serie de observaciones ($u_i = s_i / \sqrt{n_i / 2}$); 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.

B. Por las leyes de la distribución: normal, triangular y rectangular, U.

3.7.6 Ley de la 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)



PROCEDIMIENTO

Método:

Suspensiones estandarizadas:

Se preparó 10 suspensiones de *S. aureus* en solución salina, se ajustaron a 70% de transmisión en espectrofotómetro regulado a una longitud de onda de 580 nm, posteriormente se diluyeron estas suspensiones hasta alcanzar una concentración de 10^{-2} y se efectuó un recuento de las células viables presentes sobre medio Agar Triptica Soja

Exactitud y precisión:

La prueba consiste en inocular una cantidad conocida de uno de los microorganismos a la muestra problema y a un diluyente (control positivo).

Se efectuó el ensayo sobre tres lotes de jarabe de piperazina. De cada lote se tomaron 10 ml y se diluyeron en 90 ml de fosfato posteriormente se le añadió 0.1 ml de suspensión estandarizada de *staphylococcus aureus* y se realizaron diluciones hasta alcanzar una concentración de 10^{-2} y se hizo un recuento sobre Agar Triptica Soja después de 48 horas de incubación a 37°C .

En paralelo se hizo un control positivo o de crecimiento inoculando 0.1 ml de la misma suspensión de microorganismo a 100 ml de fosfato (prueba en ausencia del producto a examinar).

Este ensayo se realizó por duplicado.



Material:

- Erlenmeyer 250 ml y 300 ml, Kimax y Pyrex
- Placa petri Pyrex
- Pipetas de 1 ml, 5 ml, 10 ml
- Tubos de ensayo sin rosca y con rosca
- Probeta de 100 ml Pyrex
- Beaker 250 ml, 1000 ml Kimax
- Mechero Fisher
- Espectrofotómetro 20
- Bortex
- Balón de 1000 ml Pyrex
- Gradilla
- Cocina Corning Hotplate
- Asa de platino
- Horno Precision
- Incubadora doble Precision
- Autoclave Pelton & Crane
- Baño maria
- Solución salina
- Fosfato
- Agar Triptica Soja
- Caldo Triptica Soja
- Caldo lactosa
- Agar Saburoat
- Jarabe de piperazina
- Algodón
- Papel aluminio



DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de estudio: Experimental.

Universo: Jarabes de Piperazina elaborados en el Laboratorio Mauricio Díaz Muller, del mes Junio del 2008.

Muestras: 6 frascos de Jarabe de Piperazina del Laboratorio Mauricio Díaz Müller de lotes diferentes producidos en el periodo de Junio del año 2008.

Muestreo.-Las muestras de jarabes de Piperazina fueron solicitadas al laboratorio MDM de lotes de producciones del mes de Junio del 2008, que fueron tomados al azar a las que se les aplicaron los procedimientos descritos.

Unidad de Análisis:

10 ml de cada frasco de jarabe conteniendo 120 ml de jarabe de Piperazina.

Variables:

Dependiente: precisión y exactitud

Independiente: colonias

Variables	Definición	Medición
Exactitud	La exactitud es el porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo.	% de recuperación
Precisión	La precisión expresa la variabilidad o más menos del método analítico para determinar el grado de contaminación.	Coefficiente de variación (CV)
Colonias	Grupo de microorganismos.	UFC(Unidades Formadoras de Colonias)

Procesamiento de los datos:

Los datos fueron tabulados usando el programa digital de Excel, aplicando las pruebas de Huber y ANOVA (ANALISIS DE VARIANZA) de un factor.



RESULTADOS

Tabla N° 1: Suspensiones estandarizadas

Resultado del recuento	
numero de placa	resultado (UFC/ml) dilución 10 ⁻²
1/1	150
1/2	146
2/1	136
2/2	124
3/1	138
3/2	119
4/1	133
4/2	128
5/1	130
5/2	136
6/1	93
6/2	75
7/1	111
7/2	116
8/1	97
8/2	90
9/1	96
9/2	107
10/1	102
10/2	110
Media	116,85
Desviación estándar	20,53565577
CV %	17,57437379



Tabla N° 2: Ensayo de exactitud y precisión

	Control positivo	Lote 1	Lote 2	Lote 3
	30	25	29	36
	42	32	28	31
	41			
Promedio	37.6666667	28.5	28.5	33.5
Desviación estándar	6.65832812	4.94974747	0.707106781	3.535533906
CV%	17.6769773	17.367535	2.481076425	10.55383256

%recuperado:

Lote 1: 76.3

Lote 2: 76.3

Lote 3: 89.5



Tabla N⁰ 3: Comparación de la recuperación entre lotes

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio global
	15	25	26	
	21	23	26	
	27	24	27	
Promedio	21	24	26.33333333	23.77777778
Variación	36	1	0.33333333	12.44444444
Desviación	6	1	0.57735027	2.52578342
2*promedio de la desviación	5.05156685			
3*promedio de la desviación	7.57735027			

Tabla N⁰ 4: Carta control

Limite central + 3*desviación	Limite central + 2*desviación	Limite central	Limite central - 3*desviación	Limite central - 2*desviación
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17
31	29	24	19	17



Grafico N° 1: Grafico de control

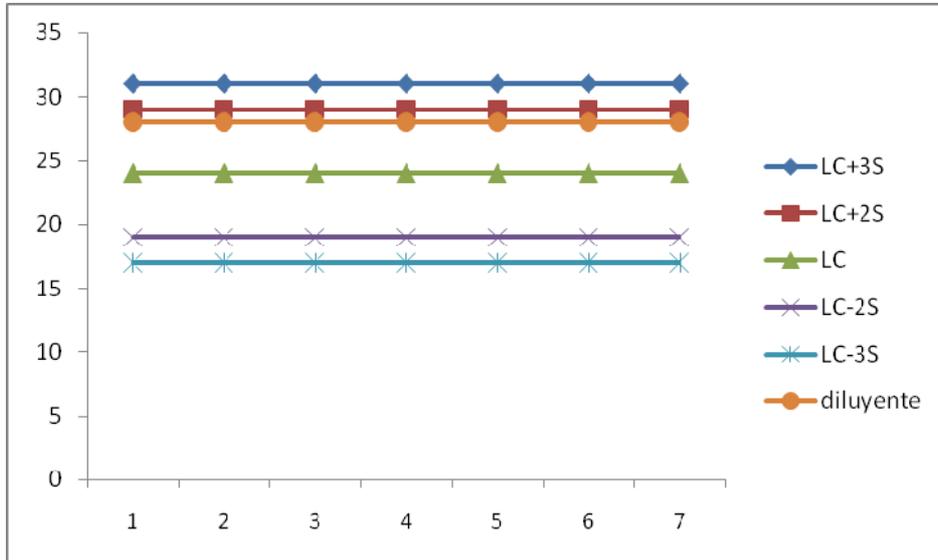


Tabla N° 5: Análisis de varianza de un factor (resumen)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Lote 1	3	63	21	36
Lote 2	3	72	24	1
Lote 3	3	79	26.33333333	0.33333333
			23.77777778	12.44444444

Tabla N° 6: Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre lote	42.88888889	2	21.44444444	1.723214286	0.256242295	5.14325285
Dentro de los lotes	74.66666667	6	12.44444444			
Total	117.5555556	8				



Tabla N^o 7: Comparación de la recuperación entre el producto y el diluyente.

	Diluyente	Producto
	20	15
	18	21
	17	27
	25	25
	21	23
	34	24
	30	26
	42	26
	41	27
Media	27,55555556	23,7777778
Desviación estándar	9,65804213	3,83333333
Variancia	93,27777778	14,6944444

Tabla N^o8: Prueba de Huber en diluyentes

Datos	Ordenado	Mediana	Valor-mediana	Ordenar	MAD
20	17		8	0	
18	18		7	4	
17	20		5	5	
25	21		4	5	
21	25	25	0	7	7
34	30		5	8	
30	34		9	9	
42	41		16	16	
41	42		17	17	

Promedio: 27.5555556

Limite inferior: 3.05555556

Limite superior: 52.0555556



Tabla N° 9: Prueba de Huber en el producto

Datos	Ordenado	Mediana	Valor-mediana	Ordenado	MAD
15	15		10	0	
21	21		4	1	
27	23		2	1	
25	24		1	1	
23	25	25	0	2	2
24	26		1	2	
26	26		1	2	
26	27		2	4	
27	27		2	10	

Promedio: 23.7777778

Limite inferior: 16.77777778

Limite superior: 30.77777778

Tabla N° 10: Análisis de varianza de un factor (resumen)

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	9	248	27.55555556	93.27777778
Columna 2	9	214	23.77777778	14.69444444

Tabla N° 11: Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre los ensayos	64.22222222	1	64.22222222	1.18960638	0.291563	4.4939984
Dentro de los ensayos	863.7777778	16	53.98611111			
Total	928	17				



Tabla N^o 12: Ensayo de límite microbiano

ENSAYO	RESULTADO	ESPECIFICACIONES
Bacterias aerobias mesofilas	Conforme	menos de 10 UFC/ g
S. aureus	Conforme	ausencia
P. aeruginosa	Conforme	ausencia
E.coli	Conforme	ausencia
salmonella sp	Conforme	ausencia
Shiguella sp	Conforme	ausencia
Hongos y levaduras	Conforme	no mas de 10 UFC/g



ANALISIS DE RESULTADOS

- La suspensión de staphylococcus aureus en solución salina al 70% de transmisión a 580 nm contiene aproximadamente $1 \cdot 10^4$ UFC/ ml, por tanto el ensayo se considera valido con una precisión de 17,57 % (Tabla N°1).
- El valor de la recuperación del inoculo en los ensayos realizados es mayor del 70% en consecuencia la exactitud se encuentra dentro de los limites establecidos demostrando que nuestro método es correcto (Tabla N°2).
- El coeficiente de variación de la recuperación del inoculo en los tres lotes es inferior al 20% por lo que se considera que el método es preciso (Tabla N°2).
- Referente al ensayo de limite microbiano el medicamento cumple con las especificaciones de la monografía oficial de la Farmacopea (Tabla N°12).
- Aplicando el test de análisis de varianza de un factor no existe diferencia significativa entre la recuperación del producto y del diluyente debido a que las variancias son homogéneas (Tabla N°11).
- No existe diferencia significativa en la recuperación del inoculo entre lotes ya que al aplicar el análisis de varianza se determino que las variancias son homogéneas (Tabla N°6).
- Aplicando la prueba de Huber se comprobó que no existen resultados aberrantes en el diluyente, en el producto existe un dato anómalo el cual no interfiere en el análisis de varianza (Tabla N°8 y 9).



CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo monográfico hemos verificado que el método utilizado en el laboratorio de control microbiológico de la UNAN-LEON para la determinación de *staphylococcus aureus* en jarabe proporciona datos confiables para las aplicaciones futuras en esta misma forma farmacéutica y con iguales condiciones de análisis

Concluimos que el método es exacto ya que el porcentaje de recuperación del inóculo se encuentra entre los límites establecido.

A través del coeficiente de variación decimos que el método es preciso porque se encuentra en el rango establecido



RECOMENDACIONES

- Los subcultivos deben mantenerse preferiblemente a la temperatura correcta (2-8°C) para obtener mejores resultados
- No realizar mas de 5 replicas de la cepa original porque incrementa el riesgo de alteración fenotípica
- Garantizar que la cristalería utilizada sea estéril para evitar contaminación o resultados aberrantes
- Aplicar las Buenas Practicas de Laboratorio
- Elaborar manuales y PNT para garantizar un buen cumplimiento de los métodos y buen uso de los equipos
- Validar todos los métodos que se aplican en control microbiológico



GLOSARIO

Medidas de tendencia central

- Media o promedio: es el centro de gravedad de los datos $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$
- Moda: es el dato más frecuente en una serie
- Mediana: es el valor medio cuando los datos se ordenan en forma ascendente o descendente

Medidas de dispersión

- Variancia: Es la suma de las desviaciones cuadráticas de la media dividida por el tamaño de la muestra. $S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$
- Desviación estándar: es la raíz cuadrada de la varianza $S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$
- Coeficiente de variación (cv): es la desviación estándar dividida por la media y expresada como porcentaje. $\frac{S}{\bar{x}} \times 100$

Prueba F: el estadístico F es la relación de las varianzas de las muestras, se usa en el análisis de la variancia

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Valores aberrantes o puntos outliers

Método de HUBER: se usa para detectar puntos “OUTLIERS” mediante el siguiente procedimiento.

1. Se ordenan los resultados de mayor a menor y se obtiene la mediana.
2. Se calcula la desviación de (r) entre los valores individuales y la mediana X_m . Se ordenan y se obtiene el valor absoluto de la mediana de las desviaciones (MAD).
3. Los valores aberrantes o outliers son los que están fuera del siguiente intervalo:

$$[(X_m - 3.5 MAD), (X_m + 3.5 MAD)]$$



ANOVA: es una técnica estadística que permite comparar más de dos medias mediante la relación de una variable independiente categórica con una variable dependiente cuantitativa

Gráficos de control: Constituyen la herramienta más poderosa para analizar variabilidad en un proceso. Son gráficos lineales que muestran en forma dinámica el comportamiento de un proceso.



BIBLIOGRAFIA

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. Barcelona Marzo 2001. Página N°141-147, 150, 170-173, 276, 284
- Ramón Salazar Macian. Validación industrial, su aplicación a la industria Farmacéutica y afines. 1ª Edición. Barcelona. 31 de mayo 1999. Pagina N° 21-69.
- United State Pharmacopea 30 National Formulary 25. Pagina N° 2723-2728.
- José Manuel González de Buitrago. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. Segunda Edición Masson. Pagina N° 97.
- Advisory commission for metrology chemistry section expert. Group for microbiology. Uncertainly of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki 2003.
- Guillermo Ramis Ramos. Maria Cecilia García Álvarez-Coque. Quimiometria. Editorial Síntesis. Pagina N° 71, 72, 73, 60, 61.
- http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus



ANEXOS

