

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



VALIDACION DEL METODO MICROBIOLOGICO CILINDRO-PLACA PARA
LA POTENCIA DEL ANTIBIOTICO LINCOMICINA CLORHIDRATO

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
SILVIA CAROLINA MUÑOZ FRANCÈS

16 DE FEBRERO
DE 1941
PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÌMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE 2006

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora:

Dra. Maria Isabel Rodríguez.

Secretaria:

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Decano:

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria:

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

Coordinadora General:

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesor de Área de Microbiología:

MC. Coralia de los Ángeles González de Díaz

Asesor de Área de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos,

Cosméticos y Veterinarios:

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

Docentes Directoras:

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Lic. Brenda Lizbeth Mejía Ramírez

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por haberme dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para poder finalizar mis estudios universitarios, y por haberme ayudado a no darme por vencida en los momentos mas difíciles de la realización de este trabajo.

A mi familia por todo el cariño y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y de mi formación profesional.

A la Lic. Ana Ilma de Gil por haberme dado la oportunidad de desenvolverme profesionalmente y sobretodo por haber confiado en mi para llevar a cabo este trabajo.

A Corporación Bonima S.A de C.V por haberme brindado todos los medios para poder realizar mi trabajo de graduación.

A mis docentes directoras MSc. Evelyn de Ramos y Lic. Brenda mejía por su colaboración incondicional y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mi tercer analista Lic. Saúl Soriano por haberme brindado su tiempo y colaboración sin la cual no se hubieran cumplido los objetivos de este trabajo.

A los docentes y personal de laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, así como también a mis amigos por haber sido una parte fundamental dentro de mi formación académica.

DEDICATORIA

A Dios, por darme sabiduría y fortaleza para lograr culminar con éxito mi carrera.

A mis padres por haber estado conmigo siempre brindándome su amor y apoyo incondicional para que nunca desistiera de realizar todos mis sueños y anhelos, por toda la ayuda que me dieron durante el desarrollo de mi vida académica, y por la formación como persona y valores que me inculcaron, gracias a ello he podido realizarme personal y profesionalmente.

A mis hermanos Mario y Jorge que son y siempre serán una parte muy importante de mi vida, por todas sus ayudas y desvelos, sin ellos no hubiera podido culminar todas mis metas trazadas.

A mis compañeras pero sobretodo amigas Lorena, Marianela, Paty y Wendy, por todos esos momentos que nos apoyamos para no darnos por vencidas nunca, por ser parte fundamental en mi formación profesional y por que siempre estuvieron conmigo en los momentos difíciles.

A todos los que de una manera u otra me apoyaron y estuvieron conmigo para nunca darme por vencida.

INDICE

Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvi
Capitulo II	
2.0 Objetivos	20
Capitulo II	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 Principios Básicos de la Validación.	22
3.2 Tipos de Validación.	23
3.3 Características Analíticas Usadas en Validación de Métodos.	24
3.4 Documentación.	31
3.5 Ensayos Microbiológicos para Antibióticos.	34
Capitulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	38
4.1 Tipo de Estudio	38
4.2 Investigación Bibliográfica.	38
4.3 Investigación de Campo	38
4.4 Parte experimental	40
Capitulo V	
5.0 Resultados y análisis de resultados	50
5.1 Resultados	50

5.2 Discusión de resultados	55
Capitulo VI	
6.0 Conclusiones	77
Capitulo VII	
7.0 Recomendaciones	81
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°

1. Puntos de la línea dosis-respuesta.
2. Resultados de valores promedio para linealidad, rango y exactitud.
3. Resultados del primer ensayo para exactitud del método.
4. Resultados del segundo ensayo para exactitud del método.
5. Resultados del tercer ensayo para exactitud del método.
6. Resultados obtenidos en placebo para la precisión del método.
7. Resultados precisión del método de analista 1 para el primer lote de validación.
8. Resultados precisión del método de analista 2 para el primer lote de validación.
9. Resultados precisión del método de analista 3 para el primer lote de validación.
10. Resultados precisión del método de analista 1 para el segundo lote de validación.
11. Resultados precisión del método de analista 2 para el segundo lote de validación.

12. Resultados precisión del método de analista 2 para el segundo lote de validación.

13. Calibración de equipos previo a la validación.

INDICE DE TABLAS

Tabla N°

1. Ensayo 1 para linealidad, exactitud y rango.
2. Ensayo 2 para linealidad, exactitud y rango.
3. Ensayo 3 para linealidad, exactitud y rango.
4. Resultados promedio para linealidad del estándar.
5. Porcentaje de recobro para el ensayo 1.
6. Porcentaje de recobro para el ensayo 2.
7. Porcentaje de recobro para el ensayo 3.
8. Resultados en placebo.
9. Resultados de precisión para analista 1, primer lote.
10. Resultados de precisión para analista 2, primer lote.
11. Resultados de precisión para analista 3, primer lote.
12. Resultados de precisión para analista 1, segundo lote.
13. Resultados de precisión para analista 2, segundo lote.
14. Resultados de precisión para analista 3, segundo lote.
15. Parámetros de linealidad del estándar.
16. Resultados globales para precisión del método.
17. Reporte de resultados globales para todo el
proceso de validación.

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

1. Linealidad del estándar ensayo 1.
2. Linealidad del estándar ensayo 2.
3. Linealidad del estándar ensayo 3.

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Elementos requeridos para ensayos de validación según USP 27.
2. Formato del protocolo de validación del método analítico.
3. Preparación de soluciones patrón y diluciones de prueba de estándares de referencia.
4. Microorganismos de prueba para ensayos de antibióticos.
5. Preparación del inóculo.
6. Tabla Militar estándar 105 E para verificar la letra correspondiente según el tamaño de la muestra.
7. Tabla militar estándar 105 E para planes de muestreo simple para una inspección normal.
8. Formato para los promedios y cálculos de potencia de la muestra.
9. Formato para los cálculos de la línea dosis-respuesta.
10. Formato para resultados de los diámetros de los halos de la curva de calibración.
11. Formato para el cálculo de la máxima y mínima zona de inhibición.
12. Formato para el cálculo de la media y el coeficiente de variación del ensayo.
13. Esquema de diluciones para estándar y muestra.
14. Preparación de las placas para la inoculación del estándar y la muestra.
15. Hoja de finalización de etapa de capacitación.
16. Tabla t de Student.
17. Ejemplo para el cálculo de potencia de antibióticos.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la validación del método microbiológico cilindro-placa para el antibiótico lincomicina clorhidrato. Esta se desarrollo según las especificaciones de la USP 27, donde fueron determinados los parámetros: linealidad, exactitud, precisión, especificidad y rango.

Para ello fueron necesarios una serie de análisis repetitivos, utilizando diferentes condiciones y distintos analistas con lo que se pone a prueba la robustez del método.

Fue necesario llevar a cabo esta validación ya que en la actualidad esta no es la metodología de análisis oficial para el antibiótico lincomicina HCl, y la Farmacopea menciona que si un método sufre una modificación o es sustituido por otro este debe ser validado.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron se avala que esta metodología a pesar que en los libros oficiales actuales esta tendiendo a desaparecer para ciertos antibióticos, esta sigue proporcionando resultados satisfactorios con una precisión, exactitud y linealidad comprobada.

Es de importancia mencionar que una validación no solamente lleva implícitos los análisis realizados, sino toda la documentación involucrada que sirve como guía para la realización de la misma, así como también nos proporciona una evidencia de que el método funciona con todas las características para el cual ha sido diseñado.

Aunque es recomendable que cuando se trata de procedimientos que han sido sustituidos por otros, es decir procedimientos no oficiales estos sean comparados con el oficial para lograr un estudio mas completo.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Durante muchos años los laboratorios de control de calidad de la industria farmacéutica, han llevado acabo una infinidad de análisis diseñados para evaluar la calidad de los diferentes productos que ahí se elaboran, estos nos proporcionan la información necesaria para saber, si el producto cumple con las características para el cual ha sido diseñado. Tomando especial importancia el caso particular de los antibióticos, debido a que con el paso del tiempo se ha descubierto que los microorganismos para los cuales han sido diseñados se están volviendo cada vez más resistentes a ellos. De ahí que debe procurarse realizar dichos ensayos de una forma mas exacta y precisa, para poder asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Esto solo es posible mediante la validación del método analítico utilizado para dicho fin.

La validación es una demostración documentada que provee un alto grado de aseguramiento que un proceso específico cumple con lo que realiza.

Existen cuatro tipos de validación:

1. Validación retrospectiva: Se realiza utilizando datos del pasado.
2. Validación Prospectiva: Se aplica a métodos nuevos.
3. Validación Concurrente: aplicada a métodos establecidos y en uso al mismo tiempo que se validan.
4. Revalidación: Repetición de la validación por cambios en el método.

En este trabajo se realizó una validación concurrente, con la cual fue evaluado el método microbiológico para determinar la potencia de antibióticos "Cilindro-Placa", contenido en el apartado <81> de la

Farmacopea de los Estados Unidos en su edición XX, para la cual se ha elegido a la Lincomocina HCL.

Se decidió trabajar con este antibiótico en particular ya que el método para su evaluación ha ido cambiando con el paso del tiempo. Debido a que en la USP XX la metodología de análisis oficial era el método cilindro-placa, luego paso a método turbidimétrico a partir de la USP XXI y finalmente desde la USP XXII hasta la actual USP 29 el método especificado como oficial es cromatografía de gas. A pesar de lo anterior hoy en día se sigue evaluando según especificaciones de la USP XX, ya que el método cilindro-placa es considerado como un ensayo de gran sensibilidad y por lo tanto de marcada confiabilidad, debido a que con su determinación es observada a simple vista la eficacia terapéutica de los antibióticos, mediante la comparación de su efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los microorganismos.

La validación fue realizada según las especificaciones de la USP 27, y los parámetros a evaluar fueron determinados según las cuatro categorías que manda dicha farmacopea en su apartado <1225> “Validación de métodos compendiales”.

Los cuales son: exactitud, precisión, especificidad, linealidad y rango, según lo especificado para ensayos de la categoría I referido a métodos analíticos de cuantificación de ingredientes activos.

Esto se llevo a cabo mediante ensayos repetitivos, utilizando las diferentes variables que establece cada parámetro, con lo cual se comprueba la funcionabilidad del método.

Ya que la validación es un requisito obligatorio para todo laboratorio según normas internacionales, las cuales pretenden establecer un alto grado de confianza y seguridad en los métodos analíticos utilizados, ya que queda demostrado científicamente que estos cumplen con las características de desempeño y funcionamiento que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Con lo que se disminuye el número de fallos y repeticiones.

Debe tomarse en cuenta que una validación no lleva implícito solamente el desarrollo experimental de los parámetros de validación, sino también toda la documentación involucrada en la misma, donde queda una evidencia de cómo fue llevado a cabo todo el proceso, y que servirá como referencia para establecer la metodología analítica que será aplicada inmediatamente finalizado el proceso.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se determinó que la validación de un método microbiológico es mucho más difícil, debido a la gran cantidad de factores que se ven involucrados en los mismos. Y que afectan en gran medida los resultados esperados. A pesar de lo anterior queda demostrado que el método microbiológico cilindro-placa es todavía una herramienta de análisis excelente para la evaluación de antibióticos ya que presenta una marcada linealidad, exactitud y sobre todo precisión, sin importar que sea realizado por distintos analistas y en condiciones de trabajo diferentes.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método microbiológico Cilindro-Placa para la potencia del antibiótico Lincomicina clorhidrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Realizar el método microbiológico cilindro-placa según especificaciones de la USP XX.

2.2.2 Evaluar los criterios de validación: exactitud, precisión, especificidad, linealidad y rango, según la USP 27.

2.2.3 Presentar toda la documentación implícita en el proceso de validación.

2.2.4 Comprobar la funcionalidad del método mencionado en la USP XX para determinar la potencia de lincomicina clorhidrato, a pesar que en la farmacopea actual ya no se considera oficial.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

3.0 MARCO TEORICO

En general la validación es una verificación necesaria para asegurar las características del desempeño y limitaciones de un método y esta ayuda a demostrar que este se encuentra científicamente regido bajo las condiciones para las cuales debe ser aplicado.

A lo largo del proceso de introducción de este termino, se le han asignado diferentes definiciones entre las cuales se puede mencionar:

Definición inicial: Probar que un proceso cumple con lo que se espera del mismo (enfatisa pruebas y análisis o sea procesos validados).

Definición ISO 9000 (2000): Confirmación y aporte de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos particulares para un uso especificado previsto (2.8.5 ISO 9000).

3.1 PRINCIPIOS BASICOS DE LA VALIDACIÓN ⁽³⁾

Para validar un proceso se hace necesario comprobar que los elementos y operaciones involucradas en el proceso estén aptos para poder dar los resultados esperados. Para ello se deben tomar en cuenta las siguientes variables:

- a) Materiales: se debe contar con proveedores certificados.
- b) Equipos e Instalaciones: incluye instrumentos y aparatos que se utilizan en el proceso. Evaluando las variaciones que puedan ocurrir durante el mismo. En cuanto a las instalaciones se deben evaluar aspectos como: temperatura del recinto, humedad, aire, etc....

c) Métodos: es necesario contar con procedimientos escritos para todas las operaciones.

d) Personal: incluye un programa de adiestramiento inicial documentado.

Los requerimientos importantes que debe poseer un método analítico para ser validado son:

- Que el método proporcione un alto grado de seguridad.
- Que el método sea consistente (que posea repetibilidad).
- Que se posea un programa documentado del método.

3.2 TIPOS DE VALIDACIÓN ⁽³⁾

Validación Retrospectiva: se basa en datos obtenidos de métodos usados con anterioridad y que se tienen documentados. Utiliza todos los resultados de los análisis y controles dentro del proceso.

Validación Prospectiva: establecimiento de un programa documentado que proporciona un alto grado de seguridad, se basa en el análisis de datos obtenidos del diseño y desarrollo de métodos nuevos.

Validación Concurrente: aplicada a pequeños cambios, revalidaciones o en procesos que no han sido validados pero son utilizados normalmente como técnica de análisis. También se aplica en los casos de nuevos fabricantes de principios activos.

Revalidación: cuando se repite parcial o totalmente una validación debido a que se han realizado cambios o se han suprimido partes del método y esto puede afectar la bondad del método validado.

3.3 CARACTERISTICAS ANALITICAS USADAS EN VALIDACION DE METODOS ⁽³⁾

Las características analíticas típicas usadas en validación de métodos son definidos por la Farmacopea la cual considera como criterios de validación los siguientes parámetros:

- Exactitud
- Precisión
- Especificad
- Limite de detección
- Limite de cuantificación
- Linealidad y rango

Según las especificaciones proporcionadas por la USP, esta establece cuatro categorías para la validación de procedimientos de ensayo, las cuales dictan diferentes características de validación para cada ensayo particular.

Estas son:

Categoría I: para métodos analíticos de cuantificación de componentes mayores o sustancias drogas a granel o ingredientes activos (incluyendo preservantes) en producto farmacéutico terminado.

Categoría II: métodos analíticos para determinación de impurezas en sustancias drogas a granel o en compuestos de degradación en producto farmacéutico terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas limite.

Categoría III: métodos analíticos para determinación de características de funcionamiento (Ej.: disolución, liberación de drogas).

Categoría IV: pruebas de identificación.

Los elementos requeridos en cada unas de las categorías y ensayos son presentados en el anexo 1.

3.3.1. EXACTITUD

Definición: la exactitud de un método analítico es la contigüidad de los resultados de pruebas obtenidas por ese método para un valor verdadero. Es decir que expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero, y la capacidad del método analítico para dar los resultados lo mas próximo posibles a dicho valor.

Si la diferencia entre el valor encontrado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. En cambio una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deben corregirse.

Matemáticamente se expresa como porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra. O en forma de la diferencia entre el valor hallado y el verdadero. Estadísticamente suele expresarse por el resultado de realizar un test de t de Student para determinar si el valor hallado y el valor considerado como verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

Si t experimental es menor a t de tablas para el riesgo escogido (en este caso de $p = 0.05$) y $n-1$ grados de libertad, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, comprobándose que el método analítico tiene la exactitud requerida. En cambio si t experimental es mayor a t de tablas significa que el método analítico no es exacto y existe un error sistémico.

Para determinar la exactitud se realiza un análisis repetitivo de una muestra de concentración conocida. La muestra generalmente será un blanco al que

se le añade una concentración conocida de analito patrón (matriz). Se analiza varias veces y se evalúa la exactitud expresado en forma de porcentaje respecto al teórico (porcentaje de recuperación) y se efectúa un test t de Student.

3.3.2. PRECISIÒN

Definición: expresa el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales cuando el método es aplicado repetidamente a múltiples muestras de una muestra homogénea. Es decir mide que tan cerca se encuentran los resultados unos de otros.

Indica el grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, osea la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra.

La precisión de un método analítico es usualmente expresada por una desviación estándar o una desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones donde la media aritmética es el valor central y la desviación estándar es la dispersión de los resultados.

Dentro del termino “precisión de un método” se dan tres tipos de estudios:

Repetibilidad: referida a la precisión del método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente en un corto intervalo de tiempo.

Su determinación se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea, que se analizan independientemente desde el principio

(preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo analista y el mismo instrumento. El número de repeticiones del análisis deberá ser superior a cinco y la concentración del analito en la muestra problema suele ser similar a lo declarado.

Puede necesitarse utilizar dos concentraciones del analito (alta y baja) o más (alta, media y baja) cada una con sus replicas cuando:

- a) La proporción del analito en la muestra tiene un rango amplio.
- b) El intervalo lineal del sistema instrumental es pequeño.

Reproducibilidad: medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes.

Su ensayo debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (diferentes días), analista e instrumentos.

La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada una de las tres variables por separado (tiempo, analista e instrumentos), deberá realizarse un análisis de varianza.

Muchas veces solo es suficiente realizar un ensayo de reproducibilidad teniendo en cuenta únicamente el tiempo.

Robustez: evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico.

Esta se recomienda cuando se precisa un estudio completo de reproducibilidad como en estudios colaborativos y comparativos interlaboratorios.

Detecta factores que originan variaciones menores y los que necesitan de una atención especial debido a que dan origen a variaciones significativas.

Por tanto se introducen deliberadamente variaciones razonables en las condiciones experimentales y se observa su influencia.

No se estudian las variables una a una, sino se introducen varios cambios a la vez para poder investigar los efectos de cada una de ellas, mediante un programa planificado para investigar muchas variables en pocas determinaciones. Para determinar la precisión esta se expresa matemáticamente por la desviación estándar o preferiblemente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). El valor aceptable de precisión de un método va a depender de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis.

También se expresa estadísticamente mediante los límites de confianza. Los cuales pueden determinarse de los resultados individuales mediante el cálculo de:

La media mas-menos la desviación estándar ($\bar{X} \pm S$)

La media mas-menos dos veces la desviación estándar ($\bar{X} \pm 2S$)

La media mas-menos la desviación estándar multiplicada por

la t de Student ($\bar{X} \pm tS$).

Estadísticamente hablando esta es la expresión más correcta ya que involucra la t de Student. Si el número de repeticiones es menor a treinta el valor de t se halla en tablas de Student para n-1 grados de libertad y su significación general será de 95%.

3.3.3. ESPECIFICIDAD ⁽¹⁴⁾

Los documentos de la ICH (Comisión Internacional de Armonización) definen la especificidad como la habilidad de fijar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puedan creer presentes como impurezas, productos de degradación o componentes matriciales.

También se dice de forma más sencilla que se trata de la medición exacta y específica del analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra.

Otras autoridades internacionales IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) y AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists) prefieren el término “selectividad” y reservan especificidad para procedimientos que son completamente selectivos. Algunos autores diferencian ambos términos y consideran:

Selectividad: capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en la misma muestra.

Especificidad: capacidad de detectar el analito sin interferencias de ningún otro compuesto.

Para métodos de prueba o ensayos esta definición tiene las siguientes implicaciones:

- a) Pruebas de identificación: garantiza la identidad del analito.
- b) Pruebas de pureza: garantiza que todos los procedimientos analíticos permitan conocer el contenido de impurezas de un analito.

c) Ensayos: provee un resultado exacto, el cual permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

En caso de determinaciones cuantitativas de un componente, el estudio de la selectividad debe asegurar que el resultado obtenido del método analítico proceda únicamente del analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

3.3.4. LIMITE DE DETECCION ⁽¹⁴⁾

Definición: característica de las pruebas limite. Es la cantidad de analito mas baja presente en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales.

El limite detección es usualmente expresado como la concentración del analito en la muestra (ppm, %, ppb, etc...). Para métodos no instrumentales los límites de detección son generalmente determinados por el análisis de muestras de concentraciones conocidas del analito y por el establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado confiable.

Para procedimientos instrumentales el mismo método es utilizado. En el caso de métodos sometidos a consideraciones como métodos compéndiales oficiales, casi nunca es necesario determinar el actual límite de detección.

3.3.5. LIMITE DE CUANTIFICACION ⁽¹⁴⁾

Es una característica de ensayos cuantitativos con bajos niveles de componentes en matrices simples.

Se puede definir como: la cantidad más baja o mínima de analito en una muestra que ha sido determinada con precisión y exactitud aceptable bajo condiciones experimentales establecidas. El limite de cuantificación se

expresa como la concentración del analito en la muestra (ppm, %, ppb, etc...). Al igual que el límite de detección cuando se trata de métodos oficiales casi nunca es necesario realizar su determinación.

3.3.6. LINEALIDAD ⁽¹⁴⁾

Definición linealidad: la farmacopea la define como la habilidad de obtener resultados de las pruebas de forma directa o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado. De lo anterior se entiende que es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Dentro del término linealidad se encuentra implícita la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta.

3.4 DOCUMENTACION

Luego de realizar la validación se debe dejar una evidencia que sea un instrumento que proporcione la información necesaria para el correcto funcionamiento del método y que garantice que los resultados obtenidos son los esperados. Aquí es donde juega un papel muy importante la documentación.

Una validación consta de la siguiente documentación:

1. protocolo de validación.
2. informes técnicos.
3. evaluación de resultados analíticos.
4. certificado de validación.

3.4.1. PROTOCOLO DE VALIDACION

Este se define como un plan experimental diseñado para que cuando se ejecute sea prueba evidencial que el método ha sido validado. Aquí se incluye una definición del método a validar y sus criterios de aceptación. (2)

Este debe ir firmado y fechado por la persona responsable de la validación.

Este se elabora antes de iniciar la validación. (Ver anexo 2)

Su esquema incluye los siguientes puntos:

- *Objetivo*: finalidad de la validación, fecha de inicio y final
 - *Responsable(s)*: se definirá el nombre y firma del responsable de llevar a cabo la validación.
 - *Parámetros a estudiar*: seleccionados de acuerdo a las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
 - *Muestras*: se describe brevemente que tipo de muestras serán utilizadas, sus características, rotulación, tratamiento previo y cuantos lotes serán usados.
 - *Métodos analíticos*: descripción del procedimiento para determinar los parámetros a evaluar. Indicando los reactivos, patrones, materiales, técnica y cálculos.
1. *Limites de aceptación*: se establecen para cada uno de los parámetros.

3.4.2. INFORMES TECNICOS

Estos incluyen referencias de calibración y cualificación de los instrumentos utilizados. Antes de iniciar la validación.

Además se deben dejar los métodos definitivos escritos con el procedimiento para determinar cada uno de los parámetros a evaluar. Así como también los resultados de las determinaciones de cada parámetro. Donde se incluyen esquemas, copias originales de espectros, cromatogramas, curvas de valoración, etc...

3.4.3. EVALUACION DE RESULTADOS ANALITICOS

Aquí se realiza una discusión de los resultados y conclusiones donde se indicara si se acepta o se rechaza la validación.

3.4.4. CERTIFICADO DE VALIDACION ⁽³⁾

Este es un documento formal de aprobación, firmado por las personas responsables. Puede ser independiente e incluir un resumen del protocolo de validación y los resultados obtenidos. Se anexa al final del informe.

3.5 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS PARA ANTIBIÓTICOS ⁽²⁾

La actividad de las sustancias antibióticas puede ser demostrada en condiciones convenientes por su efecto inhibitorio en los microorganismos.

Siendo estos ensayos clásicos o modelos, que son realizados aun a la fecha, debido a su exactitud y sensibilidad.

Así la Farmacopea de los Estados Unidos en su apartado <81> menciona los dos métodos generales que son utilizados para este tipo de evaluaciones:

1. Método cilindro-placa.
2. Método turbidimétrico.

El primero consiste en la difusión del antibiótico a través de un cilindro, generalmente de acero inoxidable, hacia el agar solidificado en una caja de petri. Y el segundo consiste en la difusión del crecimiento microbiano en una solución uniforme del antibiótico en un medio fluido favorable para el rápido crecimiento en ausencia del antibiótico.

La farmacopea indica el método a utilizar para cada antibiótico (ver anexo 3) y el microorganismo de prueba (ver anexo 4).

Generalmente el método más utilizado y sensible es el método cilindro-placa. Ya que no se tienen datos de su sustitución por el método turbidimétrico en ningún laboratorio. , debido a que se prefiere el método cilindro-placa por su exactitud y sensibilidad.

3.5.1. METODO CILINDRO-PLACA ⁽²⁾

Para cada antibiótico se selecciona el medio y microorganismo a utilizar (anexo 5). Se coloca en las cajas de petri de 100 x 20 mm una capa de agar llamada capa base y se deja solidificar. Luego se prepara un medio agar que en forma líquida es inoculado y homogenizado con una suspensión de microorganismos testigo, la cual ha sido previamente estandarizada según especificaciones. A esta se le llamará capa inoculo, la cual es vertida en la superficie de la capa base y se permite solidificar a manera que quede totalmente lisa. Sobre la superficie se colocan seis cilindros de acero inoxidable con un diámetro externo de 8 mm, diámetro interno de 6 mm y 10 mm de largo, estos a intervalos de 60° en un radio de 2.8 cm. Dentro de ellos se inoculan cantidades de concentración conocida del agente antimicrobiano. (Ver esquema en anexo N° 14)

Durante la incubación el agente antimicrobiano difunde hacia la zona que lo rodea y establece un gradiente de concentración, alcanzándose la concentración inhibitoria mínima a cierta distancia. Conforme el microorganismo crece se forma un halo turbio, excepto en la región donde la concentración de la sustancia es por arriba de la concentración inhibitoria mínima; allí es donde se observa una zona de inhibición.

El tamaño de dicha zona queda determinado por la sensibilidad del microorganismo, el tipo de medio de cultivo, las condiciones de incubación, la velocidad de difusión de la sustancia y su concentración.

Para estimar la potencia se miden los halos de inhibición y se promedian los diámetros del estándar de referencia (C), se promedian también los

diámetros obtenidos de la concentración de referencia para cada punto de la curva de calibración y para cada muestra. El promedio de los diámetros del estándar de referencia es el punto de corrección de la línea de respuesta (gran promedio). Se corrige el promedio del diámetro obtenido para cada concentración de la curva de calibración restandole este al gran promedio y luego sumandole la diferencia al promedio de cada uno de los puntos de la curva. Para la muestra se suma la diferencia del promedio de los diámetros de la muestra menos el promedio de los diámetros del estándar. Al valor de C graficado. Luego se plotean los diámetros corregidos en papel semilogarítico de dos ciclos usando la concentración del antibiótico en $\mu\text{g/mL}$, en la ordenada (escala logaritmica) y los diámetros de las zonas de inhibición en la abscisa. La línea de dosis-respuesta es dibujada a través de estos puntos por su unión. (Ver anexos N° 10 y 11)

Para calcular la máxima y mínima zona de diámetros obtenida se realiza por el desarrollo de las siguientes ecuaciones:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \qquad H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

L = calculo del diámetro de la zona de concentración mínima del estándar de la línea de dosis-respuesta.

H = calculo del diámetro de la zona de concentración máxima del estándar de la línea de respuesta.

C = promedio de los diámetros de las zonas de lectura de los puntos de la solución estándar de referencia (gran promedio).

A, B, D, E = valores promedio corregidos de las otras soluciones estándar de máxima y mínima concentración, respectivamente.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio del presente trabajo es concurrente y experimental.

El estudio concurrente es aquel en que se evalúa un método analítico el cual ha sido utilizado repetidamente y es utilizado como herramienta de análisis al mismo tiempo que es validado.

El estudio experimental se basa en ensayos repetitivos realizados dentro de un laboratorio.

Un estudio concurrente es realizado a métodos analíticos a los cuales se les conoce su comportamiento, se tienen suficiente evidencia de su funcionamiento y se esta utilizando simultáneamente a su validación.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

La investigación bibliografica se realizó en las bibliotecas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, Universidad Alberto Masferrer. Corporación Bonima S.A de C.V y consultas a Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de control de calidad, sección de microbiología de la Corporación Bonima S.A. de C.V. donde se proporcionaron los reactivos, materiales, cepas y equipo necesario para su realización.

4.3.1 MUESTREO

El muestreo es de tipo aleatorio. Para ello fueron utilizados como universo dos lotes de viales de Lincomicina HCl inyectable de 600 mg/2mL. El primer lote es el 04050181 y el segundo lote fue el 05040201. Del lote 04050181, fueron producidos un total de 151 magazines (contenedor con 253 unidades cada uno) en total fueron 38,456 unidades de Lincomicina HCl.

Del lote 05040201, fueron producidos 152 magazines con igual número de viales cada uno, haciendo un total de 38,203 unidades de Lincomicina HCl.

El muestreo fue realizado basado en las tablas militar estandar 105 E, utilizando un plan simple y nivel de inspección general II (normal).

De acuerdo al número de magazines producidos, las tablas mandan muestrear 32 magazines de cada uno de los lotes. De los cuales fueron extraídos al azar 6 o 7 unidades de cada magazine, hasta completar un total de 200 viales para cada lote. (Ver anexos 6 y 7)

La muestra total es de 400 viales, esta cantidad fue calculada en base al número de repeticiones necesarias para la validación (un mínimo de 3 repeticiones por criterio).

4.3.2 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

Ver anexos 8, 9, 10, 11 y 12.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1 LINEALIDAD Y RANGO

Ambos parámetros serán evaluados juntos ya que se encuentran en estrecha relación.

Para determinar la linealidad se utilizara un rango de concentraciones mas amplio que el intervalo de concentraciones a establecer, el cual para valoración de un principio activo en producto terminado va del 50-150%.

En este estudio será utilizada la matriz del producto (solución menos analito) y concentraciones crecientes del analito: 50, 75, 100, 125, 150%.

El análisis se efectúa por triplicado, y será realizado durante tres días diferentes. De los datos obtenidos será encontrada la ecuación de la recta de regresión: $Y = bx + a$.

Donde: x = concentración ; b = valor de la pendiente

Y = respuesta ; a = termino independiente

Para encontrar b (pendiente) será utilizada la siguiente formula:

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

Formula para encontrar a :
$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b\sum x}{n}$$

Con estos datos se realizara la curva dosis-respuesta, y será observada la linealidad, si esta parte o no del origen.

Interpretación estadística de la regresión lineal.

Para esto se determinara el coeficiente de correlación (r) mediante la formula:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

Donde r debe ser ≤ 0.999 .

Y se realizara un test de linealidad dado por el coeficiente de variación, de los factores de respuesta:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad \text{donde } s = \text{desviación estándar;}$$

$$\bar{x} = \text{promedio del contenido encontrado}$$

En donde $CV \leq 5\%$.

Para encontrar S se utilizara la formula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{para } n-1 \text{ grado de libertad.}$$

4.4.2. PRECISION

Se expresa matemáticamente por la desviación estándar o preferiblemente por el coeficiente de variación. Y se llevaran a cabo tres estudios simultáneos para su determinación:

- a) Repetibilidad
- b) Reproducibilidad: se compararan los datos obtenidos por dos distintos analistas.
- c) Robustez: modificando las siguientes variables: tiempo de escurrido de pipetas, variando el nivel de las parrillas de la incubadora y variando el período de reposo previo a la incubación.

4.4.3 EXACTITUD

Para su evaluación se utilizara la matriz del producto con las concentraciones crecientes del analito de 50, 75, 100, 125, 150% que fueron preparados para el ensayo de linealidad y será expresado como porcentaje de recuperación de la cantidad del analito presente en la muestra.

Estadísticamente se realizara un test t se Student siendo:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|m - \bar{x}| \sqrt{n}}{S}$$

donde: m = valor verdadero; n = numero de determinaciones
 \bar{x} = valor medio; S = desviación estándar

Una vez encontrado el valor de la t experimental se comparara con el valor t de tablas (anexo 20); para n-1 grados de libertad, para un riesgo de p = 0.05

4.4.4 ESPECIFICIDAD

Debido a que en estudios de estabilidad de formulaciones con Lincomicina HCl, nunca se han reportado productos de degradación y/o impurezas, y que dentro de las especificaciones farmacopeicas no hay ninguna que mencione una prueba para sustancias relacionadas. Este parámetro de validación no será estudiado, ya que se carece de antecedentes que indiquen alguna interferencia en ensayos por impurezas, excipientes o productos de degradación.

4.4.5 ENSAYO DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS SEGÚN USP XX.

4.4.5.1 PREPARACION DEL INOCULO ⁽¹²⁾

El inculo será preparado de acuerdo a la técnica de análisis “manejo de cepas de microorganismos testigo”. Utilizando *Sarcina lutea* ATCC 9341 (Ver anexo 4) en medio agar antibiótico N° 11 (Ver anexo 5) para la siembra de tubos inclinados e incubar 24 hrs. Luego pasar a botella de Roux con medio antibiótico N° 11, e incubar 24 hrs.

Obtener la suspensión final en solución salina estéril por arrastre del microorganismo con perlas de vidrio estériles.

4.4.5.2. ESTANDARIZACION DEL INOCULO ⁽¹²⁾

Estandarizar el inculo de *Sarcina lutea* ATCC 9341 al 12% de transmitancia en espectrofotómetro a 580 nm utilizando solución salina estéril como blanco.

Se utiliza una transmitancia del 12% ya que la USP especifica que el microorganismo debe ser estandarizado a una transmitancia cerca del 25%, esto quiere decir que no es exactamente el 25%, porque este valor varía para cada tipo de microorganismo y antibiótico. Por ello se debe determinar con cual transmitancia se obtendrán halos de 14-16 mm de diámetro, según lo especifica la USP. Entonces según pruebas realizadas para el microorganismo de prueba *Sarcina lutea* y el antibiótico Lincomicina esa es la transmitancia con la que se obtienen los resultados esperados.

4.4.5.3. PREPARACION DE LA CAPA INOCULO ⁽¹²⁾

Se procede a preparar la capa base, colocando 21 mL de medio agar antibiótico N° 11 en cada una de las 21 placas de petri, dejar endurecer hasta formar una capa lisa de profundidad uniforme. Luego añadir 4 mL de agar antibiótico N° 11 inoculado con *Sarcina lutea* ATCC 9341 estandarizada y extender la capa inoculo sobre la superficie del inoculo de manera uniforme y permitir que endurezca.

Colocar 6 cilindros de acero inoxidable debidamente calibrados, utilizando un colocador de penicilindros Mayasa.

4.4.5.4. PREPARACION DEL ESTANDAR ⁽¹²⁾

Pesar una cantidad equivalente a 25 mg de Lincomicina HCl calidad USP, y transferir a un balón volumétrico de 25.0 mL y agregar 10.0 mL de agua purificada estéril, mezclar y llevar a volumen con el agua. Luego tomar una alícuota de 5.0 mL y llevarla a un balón volumétrico de 50 mL agregar 10.0 mL de buffer N° 3 estéril y mezclar, llevar a volumen con el buffer. Tomar una alícuota de 5.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con buffer N° 3 estéril. Donde se alcanza una concentración de 10 µg/mL. (Ver anexo 13)

4.4.5.5. PREPARACION DE LA LINEA DOSIS-RESPUESTA

Cuadro N° 1 Puntos de la línea dosis-respuesta ⁽⁴⁾

punto	Alícuota de estándar	Volumen llevado	Concentración final
A	1.28 mL ó 1.30 mL*	10.00 mL	1.28 µg/mL ó 1.30 µg/mL*
B	1.60 mL	10.00 mL	1.60 µg/mL
C	10.00 mL	50.00 mL	2.00 µg/mL
D	2.50 mL	10.00 mL	2.50 µg/mL
E	3.12 mL ó 3.15 mL*	10.00 mL	3.12 µg/mL ó 3.15 µg/mL*

*Alícuotas dependen del tipo de graduación que tenga la bureta. Tomar en cuenta para corregir en la grafica.

Nota: todas las diluciones y aforos serán realizados con buffer N° 3.

4.4.5.6 PREPARACION DE LA MUESTRA ⁽¹²⁾

Se trabajaran 2 muestras:

1- Matriz mas estándar: a la solución matriz se la adiciona una solución de Lincomicina HCl preparada con un estándar de trabajo a diferentes concentraciones según la prueba: 50, 75, 100, 125, 150% de principio activo. Se realizaran las diluciones adecuadas para alcanzar la misma concentración del estándar C: 2.00 µg/mL aforando con buffer N° 3.

Nota: la primera dilución de la matriz siempre se realizara con agua purificada estéril.

2- Vial de Lincomicina HCl: transferir el contenido de no menos de 15 unidades de Lincomicina HCl 600 mg/mL a un beaker y agitar para homogenizar la muestra. Tomar una alícuota equivalente a 996 mg de Lincomicina HCl llevar a un balón volumétrico de 200.0 mL y disolver con

10 mL de agua purificada estéril, llevar a volumen. Luego tomar una alícuota de 2.0 mL y llevar a un balón de 50.0 mL, agregar 10.0 mL de buffer N° 3 y mezclar bien, llevar a volumen con buffer. Tomar una alícuota de 1.0 mL y llevar a un balón de 100.0 mL, mezclar con 10.0 mL de buffer N° 3 y llevar a volumen con el buffer. Concentración final cerca de 2 µg/mL.

4.4.5.7. INOCULACION DE CILINDROS

Inocular Alternadamente con ayuda de una micropipeta calibrada con 200 µL tres cilindros con la solución del estándar C y los otros tres con la muestra a concentración similar al estándar. Repetir el mismo procedimiento para la línea dosis-respuesta. (Ver anexo 14)

4.4.5.8. INCUBACION ⁽¹²⁾

Colocar las placas inoculadas en cada parrilla de la incubadora en bloques de tres placas como máximo e incubar a una temperatura de 32-35 C° por 16-18 hrs

4.4.5.9 LECTURA DE HALOS DE INHIBICION

Remover los cilindros medir y registrar los diámetros de cada zona de inhibición de crecimiento con la ayuda de un medidor de halos Fisher-Lilly, y procesar los datos obtenidos para realizar la línea dosis-respuesta, y determinar las concentraciones de cada muestra de forma grafica.

4.4.5.10 CALCULOS

1-Promediar los diámetros de los halos de las concentraciones de los estándares A, B, D, E y de la concentración de referencia.

2-Corregir es el diámetro de cada concentración con el promedio de C (concentración de referencia) así:

$$(\bar{x}_C - \bar{x}_A) + A = A \text{ corregido} \quad (\bar{x}_C - \bar{x}_D) + D = D \text{ corregido}$$

$$(\bar{x}_C - \bar{x}_B) + B = B \text{ corregido} \quad (\bar{x}_C - \bar{x}_E) + E = E \text{ corregido}$$

Donde:

* \bar{x}_C es el promedio de los halos de la sustancia de referencia (gran promedio).

* $\bar{x}_{A,B,D \text{ y } E}$ es el promedio de la sustancia de referencia en cada uno de los puntos de la línea dosis respuesta.

* A,B,D y E es el promedio de los halos en los diferentes puntos de la línea dosis respuesta.

3- Utilizando los valores corregidos, determinar la zona máxima y mínima de los diámetros con las formulas:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

4- Graficar en papel semilogarítmico de dos ciclos, los valores de H y L. trazar la línea dosis-repuesta y encontrar el promedio del punto central en la grafica (C graficado).

5- Determinar los promedios de las muestras y el estándar C de cada una de ellas y sacar la diferencia así: $(\bar{x}_{MX} - \bar{x}_{ST})$

6- Corregir los diámetros de los halos de la muestra, para interpolar en la

línea dosis-respuesta así: $C_{\text{corregido}+(\bar{x}_{MX}-\bar{x}_{ST})}$

Donde: $C_{\text{corregido}}$ equivale a $C_{\text{graficado}}$

7- La concentración obtenida de interpolar la muestra se multiplica por el factor de dilución, para encontrar la verdadera concentración. Proceder para encontrar la potencia.

8- Con la potencia obtenida proceder a realizar los cálculos para cada parámetro de validación según formulas presentadas.

9- Tabular los datos y presentar la respectiva documentación.

Ver ejemplo en anexo N° 17.

CAPITULO V
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Resultados.

Linealidad, Rango y Exactitud del método.

Cuadro N° 2 Resultados de valores promedio para linealidad, rango y exactitud

concentración de principio activo	Resultado promedio			desviación estándar	coeficiente de variación
	ensayo #1	ensayo #2	ensayo #3		
75%	77.70%	79.00%	78.30%	0.65%	0.83%
100%	81.10%	81.10%	80.80%	0.17%	0.21%
125%	83.60%	83.10%	83.90%	0.40%	0.48%

Porcentaje de recobro

Cuadro N° 3 Resultados del primer ensayo para exactitud del método

Muestra	75%		100%		125%	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.45	96.7	2	100	2.6	104
2	1.45	96.7	2	100	2.6	104
3	1.45	96.7	2	100	2.6	104
Promedio	1.45	96.7	2	100	2.6	104

Cuadro N° 4 Resultados del segundo ensayo para exactitud del método

Muestra	75%		100%		125%	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.46	97.3	2	100	2.6	104
2	1.5	100	2.05	102.5	2.55	102
3	1.46	97.3	2	100	2.6	104
Promedio	1.47	98.2	2.02	100.8	2.58	103.3

Cuadro N° 5 Resultados del tercer ensayo para exactitud del método

Muestra	75%		100%		125%	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.46	97.3	2	100	2.61	104.4
2	1.46	97.3	2	100	2.61	104.4
3	1.46	97.3	2.03	101.5	2.61	104.4
Promedio	1.46	97.3	2.01	100.5	2.61	104.4

Precisión del método: Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.***En Placebo.***

Cuadro N° 6 Resultados en placebo para precisión del método

Número de muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3
1	103.50%	103.50%	101.50%
2	101.50%	101.00%	101.50%
3	101.50%	101.00%	101.50%
Promedio	102.20%	101.80%	101.50%
C.V	1.13%	1.42%	0.00%

Desviación estándar global: 0.35% Coeficiente de variación global: 0.34%

En producto terminado:***Primer lote Lincomicina 600 mg/2 mL Lote: 04050181***

Cuadro N° 7 Resultados precisión del método de analista 1 para el primer lote de validación

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	101.5%	101.0%	101.5%	101.9%	1.33%
	2	101.5%	103.5%	101.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		
1.5 horas	1	101.5%	103.5%	103.5%	101.6%	1.22%
	2	101.5%	101.0%	99.5%		
	3	101.5%	101.0%	101.5%		
1.0 hora	1	101.5%	103.5%	103.5%	102.6%	1.42%
	2	101.5%	103.5%	103.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		

Coeficiente de variación global: 1.32%

Cuadro N° 8 Resultados precisión del método de analista 2 para el primer lote de validación

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	101.5%	101.0%	100.5%	100.8%	0.36%
	2	100.5%	101.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		
1.5 horas	1	101.5%	102.0%	100.5%	101.0%	0.55%
	2	101.5%	101.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		
1.0 hora	1	101.5%	99.5%	101.5%	100.8%	0.66%
	2	100.5%	101.0%	100.5%		
	3	101.5%	101.0%	100.5%		

Coefficiente de variación global: 0.52%

Cuadro N° 9 Resultados precisión del método de analista 3 para el primer lote de validación.

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.2%	1.30%
	2	102.0%	102.0%	104.0%		
	3	99.5%	104.0%	102.0%		
1.5 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.5%	1.00%
	2	104.5%	102.0%	102.0%		
	3	102.0%	102.0%	104.0%		
1.0 hora	1	102.0%	102.0%	104.0%	102.9%	1.10%
	2	104.5%	104.0%	104.0%		
	3	102.0%	102.0%	102.0%		

Coefficiente de variación global: 1.11%

Segundo lote Lincomicina 600 mg/2 mL Lote: 05040201

Cuadro N° 10 Resultados precisión del método de analista 1 para el segundo lote de validación

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	104.5%	101.5%	104.5%	103.10%	1.41%
	2	104.5%	101.5%	103.5%		
	3	102.0%	101.5%	104.5%		
1.5 horas	1	102.0%	103.5%	103.5%	102.60%	1.87%
	2	99.5%	105.0%	103.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		
1.0 hora	1	104.5%	103.5%	104.5%	103.00%	1.65%
	2	99.5%	103.5%	104.5%		
	3	102.0%	101.5%	103.5%		

Coefficiente de variación global: 1.57%

Cuadro N° 11 Resultados precisión del método de analista 2 para el segundo lote de validación

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	100.5%	101.0%	100.5%	101.00%	0.65%
	2	100.5%	102.0%	100.5%		
	3	101.5%	102.0%	100.5%		
1.5 horas	1	100.5%	101.0%	101.5%	101.20%	0.61%
	2	100.5%	102.0%	101.5%		
	3	100.5%	102.0%	101.5%		
1.0 hora	1	100.5%	102.0%	101.5%	101.10%	0.64%
	2	101.5%	102.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		

Coefficiente de variación global: 0.61%

Cuadro N° 12 Resultados precisión del método de analista 3 para el segundo lote de validación

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.70%	0.97%
	2	102.0%	102.0%	104.0%		
	3	102.0%	104.0%	104.0%		
1.5 horas	1	102.0%	102.0%	104.0%	102.40%	0.86%
	2	102.0%	102.0%	102.0%		
	3	102.0%	104.0%	102.0%		
1.0 hora	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.70%	1.06%
	2	102.0%	102.0%	102.0%		
	3	104.5%	104.0%	104.0%		

Coefficiente de variación global: 0.92%

5.2 Discusión de los resultados

a) Determinación de linealidad y rango.

Se obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0.998045. Así como también fue determinado el rango de trabajo para el cual el ensayo proporciona una grafica de tendencia lineal siendo este rango del 75, 50 y 125% de la concentración de principio activo.

b) Determinación de precisión.

La precisión del método fue medida en dos partes:

1. Repetibilidad y reproducibilidad en placebo.

Aquí se obtuvo un coeficiente de variación promedio de 0.34%.

2. Repetibilidad, reproducibilidad y robustez en producto terminado.

Para este fin fueron utilizados dos lotes de producto terminado (vial x 2 mL de solución inyectable de lincomicina 600 mg). En donde para el lote No 1 (04050181) se obtuvo un coeficiente de variación promedio de 0.98%, y para el lote No 2 (04050201) el coeficiente de variación promedio fue de 1.03%. esto como resultado de tres ensayos realizados por tres analistas diferentes para cada lote.

La robustez fue determinada utilizando distintas variables que se consideran pueden llegar a afectar al ensayo en determinado momento. Estas variables fueron además del uso de tres analistas diferentes, el tiempo de escurrimiento de las pipetas luego de la toma de cada alícuota el cual fue uniformado a 8 segundos para los volúmenes requeridos y el tiempo de reposo previo a la incubación de las placas ya inoculadas, para el cual fueron dejadas 1, 1.5 y 2

horas. Observándose que el diámetro promedio obtenido en 1 hora fue de 18.9 mm, a 1.5 horas de 19.6 mm y a 2 horas de 19.8 mm.

Con estos resultados se establece que el tiempo de reposo previo a la incubación sera de 1.5 a 2.0 horas como maximo.

c) Determinación de exactitud.

Esta fue determinada mediante la linealidad del método, utilizando concentraciones teóricas conocidas del estándar de 75, 100 y 125%, donde se obtuvo un coeficiente de variación para el 75% de 0.83%; para 100% de 0.21% y para 125% de 0.48.

El coeficiente de correlación promedio fue de 0.998045 y el porcentaje de recobro fue del 96.7 al 104.4%.

Toda la documentación implícita en el proceso de validación se presenta en los anexos

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

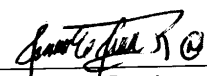
Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

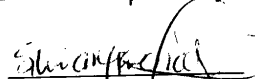
Área: Microbiología.

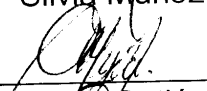
Fundamento de la validación: Validación de tipo concurrente.

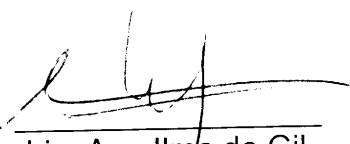
- i. Justificación: Método utilizado como oficial hasta 1980, por la USP XX. La cual era vigente en ese momento. Este método se sigue utilizando a pesar que a partir de la USP XXI el método fue sustituido.
- ii. Descripción: La validación del método fue desarrollado determinando las pruebas que la USP 27 asigna para la categoría I que corresponde a pruebas de contenido: linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad y robustez), exactitud y rango.
- iii. Fechas de la validación: Fecha de inicio: Mayo/2005
Fecha final: Octubre/2005
- iv. Responsables:
Analistas :Lic. Brenda Mejía/Lic. Saúl Soriano/Silvia Muñoz.
Jefe laboratorio de microbiología: Lic. Aída de Gutiérrez.
Gerente de control de calidad: Lic. Ana Ilma de Gil.

Analistas: 
Lic. Brenda Mejía.


Lic. Saúl Soriano.


Silvia Muñoz.

Aprobado: 
Lic. Aída de Gutiérrez
Jefe laboratorio microbiología


Lic. Ana Ilma de Gil.
Gerente de control de calidad

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

Área: Microbiología.

v. Parámetros a estudiar-frecuencia / especificación:

Parámetro	Especificación	Reporte
<p>a) <u>Linealidad y rango del estándar</u></p> <p><u>Ensayo previo:</u> Preparar una serie de estándares de trabajo de lincomicina HCl, con concentraciones crecientes: 75%, 100% y 125%. Realizar en tres días diferentes.</p>	<p>coeficiente de correlación ≥ 0.99</p>	<p>Coeficiente de correlación: Ensayo 1: 0.99614422 Ensayo 2: 0.999901 Ensayo 3: 0.99809221 Ver figuras No1,2 y 3 respectivamente.</p>
<p>b) <u>Precisión del método: repetibilidad, reproducibilidad y robustez.</u></p> <p>1. <u>En placebo</u> A un placebo de la solución inyectable adicionarle estándar a concentración del 100% de principio activo. Realizar en tres días diferentes.</p> <p>2. <u>En producto terminado</u> Realizar ensayos a muestras de dos lotes diferentes de lincomicina HCl solución inyectable. Realizar en tres días diferentes. Por tres analistas diferentes. Para ambos casos cada analista utilizará los tiempos de escurrimiento permitidos por el fabricante de las pipetas según sea el caso</p>	<p>Coeficiente de variación no debe ser mayor al 5%</p> <p>Coeficiente de variación no debe ser mayor al 5%</p>	<p>Coeficiente de variación: Ensayo 1: 1.13 % Ensayo 2: 1.42 % Ensayo 3: 0.00 % Ver tabla No 8.</p> <p>Coeficiente de variación: <u>Lote 04050181.</u> Analista 1: 1.32 % Analista 2: 0.52 % Analista 3: 1.11 % Ver tabla No 9, 10 y 11 respectivamente.</p> <p><u>Lote 04050201.</u> Analista 1: 1.34 % Analista 2: 0.52 % Analista 3: 0.94 %</p>

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

Área: Microbiología.

Parámetro	Especificación	Reporte
<p>- Determinación De precisión en producto terminado:</p> <p>* Realizado por tres analistas, con cuidado que cada ensayo individual sea incubado en el mismo nivel de la incubadora, con su respectiva curva.</p> <p>* Cada uno de los analistas hará los tres ensayos dejando en reposo previo a la incubación (después de haber inoculado los cilindros) por 1.0 hr , 1.5 hrs y 2.0 hrs.</p>	<p>Coefficiente de variación no debe ser mayor al 5%</p>	<p>*Ver comentario en informe técnico</p> <p>Coefficiente de variación para el lote 04050181 a: <u>1.0 hr. 1.5 hrs. 2.0 hrs.</u></p> <p>A₁ 1.42% 1.22% 1.33% A₂ 0.66% 0.55% 0.36% A₃ 1.10% 0.97% 1.29%</p> <p>Coefficiente de variación para el lote 04050201 a: <u>1.0 hr. 1.5 hrs. 2.0 hrs.</u></p> <p>A₁ 1.65% 1.87% 1.41% A₂ 0.64% 0.61% 0.65% A₃ 1.06% 0.86% 0.97%</p>
<p>c) Exactitud: Recobro Se determinara mediante la linealidad del método.</p> <p>* Adicionar concentraciones teóricas conocidas de la matriz para obtener concentraciones de 75%, 100% y 125%.</p>	<p>Coefficiente de variación variación no debe ser mayor al 5%</p> <p>coeficiente de correlación ≥ 0.99 % de recobro debe ser entre 95% - 105%</p>	<p>Coefficiente de variación 75%: 1.8% Coefficiente de variación 100%: 1.1% Coefficiente de variación 125%: 0.70%</p> <p><u>Coefficiente de correlación:</u> Ensayo 1: 0.99614422 Ensayo 2: 0.999901 Ensayo 3: 0.99809221</p> <p><u>% recobro:</u> Ensayo 1: 96.7 - 104.0% Ensayo 2: 97.3 - 104.0% Ensayo 3: 97.3 - 104.4%</p>

concentración de principio activo	ensayo 1
75%	77.70%
100%	81.10%
125%	83.60%

R coef de correl 0.99614422

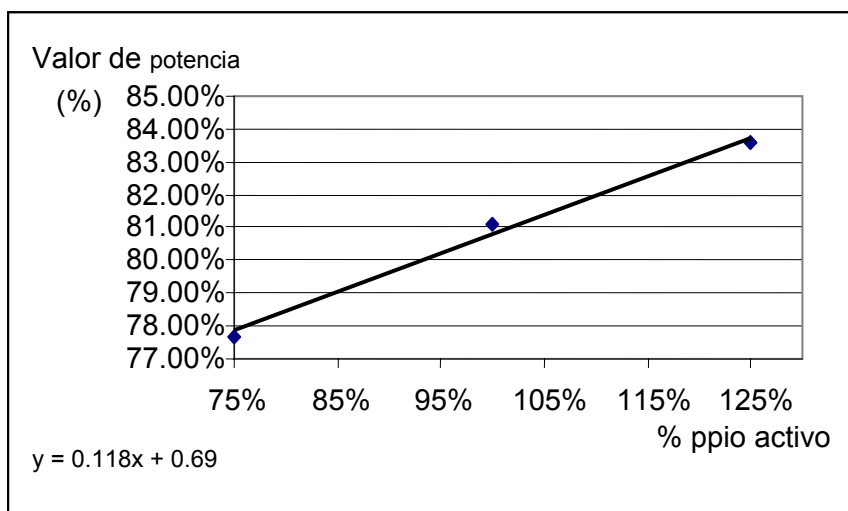


Figura N° 1 linealidad del estándar ensayo 1

concentración de principio activo	ensayo 2
75%	79.00%
100%	81.10%
125%	83.10%

R coef de correl 0.999901

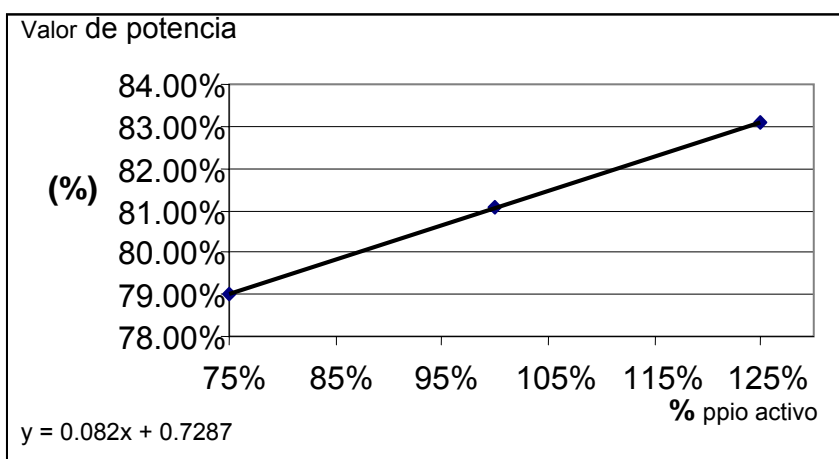


Figura N° 2 linealidad del estándar ensayo 2

concentración de principio activo	ensayo 3
75%	78.30%
100%	80.80%
125%	83.90%

R coef de correl 0.99809221

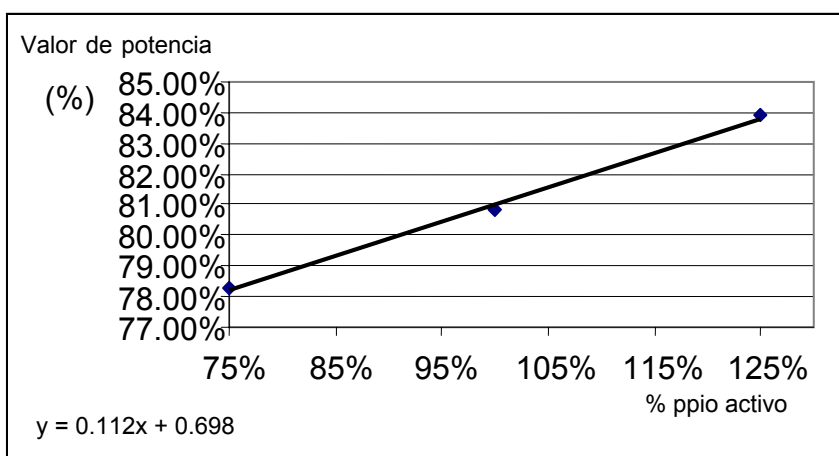


Figura N° 3 linealidad del estándar ensayo 3

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Área: Microbiología.

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa para determinación de potencia de lincomicina 600mg/2mL.

Tipo de validación: Concurrente.

Fecha de inicio: 2005-05-23.

Fecha final: 2005-10-12.

Responsables:

Analistas:

- Lic. Brenda Lizbeth Mejía.
- Lic. Saúl Ernesto Soriano.
- Silvia Carolina Muñoz.

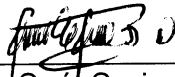
Jefe de laboratorio de microbiología:

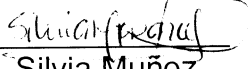
- Lic. Aída de Gutiérrez.


Gerente de control de calidad:

- Lic. Ana Ilma de Gil.

Analistas: 
Lic. Brenda Mejía.


Lic. Saúl Soriano.


Silvia Muñoz.

Aprobado: 
Lic. Aída de Gutiérrez
Jefe laboratorio microbiología


Lic. Ana Ilma de Gil.
Gerente de control de calidad

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Cuadro N° 13 Calibración de equipos previa a la validación.

Equipo	Fecha de calibración	Observación	Dictamen
* Balanza analítica Mettler Toledo AG 245	2005-03-11		Cumple
* Repetidora Eppendorf X014-1	2004-05-05		Cumple
* Pipeta Eppendorf 164665	2004-05-04		Cumple
* Incubadora Lab-line modelo 305 de 32-35°C	2004-02-04		Cumple
* Colorímetro Spectronic 20 Génesis	2005-03-08		Cumple
* Penicilindros de acero inoxidable	2004-10-26	incluye limpieza, el 2005-04-05 fueron limpiados nuevamente	Cumple
*Mesa de acero inoxidable		Nivelación: 2005-04-06 y 2005-06-04	Cumple

1. Métodos definitivos para evaluar cada uno de los parámetros de validación.

a) Linealidad, Rango y Exactitud del método.

Preparar una serie de tres estándares de trabajo de lincomicina HCl y realizar tres ensayos en días diferentes, con concentraciones del 75, 100 y 125 % de la siguiente manera:

Concentración del 75%

Peso \equiv 50mg \rightarrow 50 mL

de
estándar

\downarrow
2 mL \rightarrow 200 mL

\downarrow
1.5 mL \rightarrow 10 mL (1.5 mcg/mL)

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Concentración del 100%

Peso \equiv 50mg \rightarrow 50 mL
 de
 estándar $\quad \downarrow$
 $2 \text{ mL} \rightarrow 200 \text{ mL}$
 $\quad \downarrow$
 $5 \text{ mL} \rightarrow 50 \text{ mL} \quad (2 \text{ mcg/mL})$

Concentración del 125%

Peso \equiv 50mg \rightarrow 50 mL
 de
 estándar $\quad \downarrow$
 $2 \text{ mL} \rightarrow 200 \text{ mL}$
 $\quad \downarrow$
 $2.5 \text{ mL} \rightarrow 10 \text{ mL} \quad (2.5 \text{ mcg/mL})$

Especificaciones:

- Coeficiente de variación no mayor al 5%
- Coeficiente de correlación ≥ 0.99
- Grafica de regresión debe ser lineal
- Porcentaje de recobro entre 95 y 105%

Ejm. Ensayo 1 Exactitud (Recobro)

(75%)

1.50 mcg/mL -----100% $X = 96.7\%$
 1.45 mcg/mL----- X

(100%)

2.00 mcg/mL -----100% $X = 100.0\%$
 2.00 mcg/mL----- X

(125%)

2.50 mcg/mL -----100% $X = 104.0\%$
 2.60 mcg/mL----- X

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

b) Precisión del método: Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

A un placebo de la solución inyectable adicionarle estándar de trabajo a concentración del 100% (concentración final de 2 mcg/mL). Y realizar tres ensayos en días diferentes.

Especificación:

- Coeficiente de variación no mayor al 5%

A dos lotes diferentes de lincomicina 600mg/2mL, realizar tres ensayos en días diferentes, por tres analistas diferentes, utilizando el tiempo de escurrimiento de las pipetas de 8 segundos para cada alícuota tomada. Dejando en reposo las placas previo a su incubación durante 1.5 horas.

Alícuota \equiv 50mg \rightarrow 50 mL

↓
2 mL \rightarrow 200 mL

↓
5 mL \rightarrow 50 mL (2 mcg/mL)

Especificación:

- Coeficiente de variación no mayor al 5%

Para todos los parámetros se utilizara:

- Agua purificada estéril, como primer diluyente.
- Buffer pH 8.0 para las diluciones subsecuentes.
- Media Agar antibiótico No 11 para capa base y capa inóculo.
- *Sarcina Lutea* (*Kocuria rizophila*) ATCC 9341 al 12% T. como microorganismo de prueba.
- Estándar USP de lincomicina HCl (solo linealidad, rango y exactitud)
- Estándar de trabajo de lincomicina HCl.

Y para todos los casos se realizara la curva de calibración de la siguiente manera:

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Solución madre del estándar

$$\begin{array}{l} \equiv 996\text{mg} \rightarrow 200 \text{ mL} \\ \downarrow \\ 2 \text{ mL} \rightarrow 50 \text{ mL} \\ \downarrow \\ 1 \text{ mL} \rightarrow 100 \text{ mL} \quad (1.99 \text{ mcg/mL}). \end{array}$$

Puntos de la línea dosis-respuesta.

Punto	Alícuota de estándar	Volumen llevado	Concentración final
A	1.30 mL	10.0 mL	1.30 $\mu\text{g/mL}$
B	1.60 mL	10.0 mL	1.60 $\mu\text{g/mL}$
C	10.00 mL	50.0 mL	2.00 $\mu\text{g/mL}$
D	2.50 mL	10.0 mL	2.50 $\mu\text{g/mL}$
E	3.15 mL	10.0 mL	3.15 $\mu\text{g/mL}$

2. Comentarios.

- No se logro cumplir con colocar cada ensayo en el mismo nivel de la incubadora con su respectiva curva como dice el protocolo, debido a la capacidad de la misma.
- Las concentraciones de estándar de trabajo para determinar linealidad, rango y exactitud son del 75 al 125%, debido a que al 50 y 150% los valores graficados no entran en la curva de calibración. Esto fue comprobado luego de realizar dos ensayos, el tercero no se realizo para no desperdiciar materiales.
- La curva de calibración fue modificada a los valores presentados anteriormente debido a la capacidad de la bureta la cual tiene una escala de 0.5 mL y por ello se redondearon los valores de las alícuotas tomadas.

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

3. Resultados

Linealidad, Rango y Exactitud del método.

Tabla N° 1 Ensayo #1 para linealidad, exactitud y rango

Concentración de principio activo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
50%	_____	_____	_____
75%	77.7%	77.7%	77.7%
100%	80.4%	80.4%	82.4%
125%	83.6%	83.6%	83.6%
150%	_____	_____	_____

Tabla N° 2 Ensayo #2 para linealidad, exactitud y rango

Concentración de principio activo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
50%	_____	_____	_____
75%	78.3%	80.4%	78.3%
100%	80.4%	82.4%	80.4%
125%	83.6%	82.0%	83.6%
150%	_____	_____	_____

Tabla N° 3 Ensayo #3 para linealidad, exactitud y rango

Concentración de principio activo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
50%	_____	_____	_____
75%	78.3%	78.3%	78.3%
100%	80.4%	80.4%	81.6%
125%	83.9%	83.9%	83.9%
150%	_____	_____	_____

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Tabla N° 4 **Resultados promedio para linealidad del estándar**

concentración de principio activo	Resultado promedio			desviación estándar	coeficiente de variación
	ensayo #1	ensayo #2	ensayo #3		
75%	77.70%	79.00%	78.30%	0.65%	0.83%
100%	81.10%	81.10%	80.80%	0.17%	0.21%
125%	83.60%	83.10%	83.90%	0.40%	0.48%

Rango lineal, Recta de regresión, desviación de la ordenada al origen. Ver tabla No 15 en evaluación de resultados analíticos.

Porcentaje de recobro: del 96.7 al 104.4 %.

Tabla N° 5 **Porcentajes de recobro para el ensayo 1**

Muestra	75%		100%		125%	
	65/2005		66/2005		67/2005	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.45	96.7	2.00	100.0	2.60	104.0
2	1.45	96.7	2.00	100.0	2.60	104.0
3	1.45	96.7	2.00	100.0	2.60	104.0
Promedio	1.45	96.7	2.00	100.0	2.60	104.0

Tabla N° 6 **Porcentajes de recobro para el ensayo 2**

Muestra	75%		100%		125%	
	79/2005		80/2005		81/2005	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.46	97.3	2.00	100.0	2.60	104.0
2	1.50	100.0	2.05	102.5	2.55	102.0
3	1.46	97.3	2.00	100.0	2.60	104.0
Promedio	1.47	98.2	2.02	100.8	2.58	103.3

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Tabla N° 7 Porcentajes de recobro para el ensayo 3

Muestra	75%		100%		125%	
	96/2005		87/2005		98/2005	
	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro	mcg/ml	% recobro
1	1.46	97.3	2.00	100.0	2.61	104.4
2	1.46	97.3	2.00	100.0	2.61	104.4
3	1.46	97.3	2.03	101.5	2.61	104.4
Promedio	1.46	97.3	2.01	100.5	2.61	104.4

Precisión del método: Repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

En Placebo.

Tabla N° 8 Resultados en placebo

Número de muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3
1	103.50%	103.50%	101.50%
2	101.50%	101.00%	101.50%
3	101.50%	101.00%	101.50%
Promedio	102.20%	101.80%	101.50%
C.V	1.13%	1.42%	0.00%

Desviación estándar global: 0.35% Coeficiente de variación global: 0.34%

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

En producto terminado:

Primer lote Lincomicina 600 mg/2 mL Lote: 04050181

Tabla N° 9 Resultados precisión para analista 1, primer lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	101.5%	101.0%	101.5%	101.9%	1.33%
	2	101.5%	103.5%	101.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		
1.5 horas	1	101.5%	103.5%	103.5%	101.6%	1.22%
	2	101.5%	101.0%	99.5%		
	3	101.5%	101.0%	101.5%		
1.0 hora	1	101.5%	103.5%	103.5%	102.6%	1.42%
	2	101.5%	103.5%	103.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		

Coefficiente de variación global: 1.32%

Tabla N° 10 Resultados precisión para analista 2, primer lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	101.5%	101.0%	100.5%	100.8%	0.36%
	2	100.5%	101.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		
1.5 horas	1	101.5%	102.0%	100.5%	101.0%	0.55%
	2	101.5%	101.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		
1.0 hora	1	101.5%	99.5%	101.5%	100.8%	0.66%
	2	100.5%	101.0%	100.5%		
	3	101.5%	101.0%	100.5%		

Coefficiente de variación global: 0.52%

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Tabla N° 11 Resultados precisión para analista 3, primer lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.2%	1.30%
	2	102.0%	102.0%	104.0%		
	3	99.5%	104.0%	102.0%		
1.5 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.5%	1.00%
	2	104.5%	102.0%	102.0%		
	3	102.0%	102.0%	104.0%		
1.0 hora	1	102.0%	102.0%	104.0%	102.9%	1.10%
	2	104.5%	104.0%	104.0%		
	3	102.0%	102.0%	102.0%		

Coefficiente de variación global: 1.11%

_Segundo lote Lincomicina 600 mg/2 mL Lote: 05040201

Tabla N° 12 Resultados precisión para analista 1, segundo lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	104.5%	101.5%	104.5%	103.10%	1.41%
	2	104.5%	101.5%	103.5%		
	3	102.0%	101.5%	104.5%		
1.5 horas	1	102.0%	103.5%	103.5%	102.60%	1.87%
	2	99.5%	105.0%	103.5%		
	3	99.5%	103.5%	103.5%		
1.0 hora	1	104.5%	103.5%	104.5%	103.00%	1.65%
	2	99.5%	103.5%	104.5%		
	3	102.0%	101.5%	103.5%		

Coefficiente de variación global: 1.57%

INFORMES TECNICOS DE VALIDACION DE METODO ANALITICO.

Fecha de elaboración: 2005-11-22.

Tabla N° 13 Resultados precisión para analista 2, segundo lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	100.5%	101.0%	100.5%	101.00%	0.65%
	2	100.5%	102.0%	100.5%		
	3	101.5%	102.0%	100.5%		
1.5 horas	1	100.5%	101.0%	101.5%	101.20%	0.61%
	2	100.5%	102.0%	101.5%		
	3	100.5%	102.0%	101.5%		
1.0 hora	1	100.5%	102.0%	101.5%	101.10%	0.64%
	2	101.5%	102.0%	100.5%		
	3	100.5%	101.0%	100.5%		

Coefficiente de variación global: 0.61%

Tabla N° 14 Resultados precisión para analista 3, segundo lote

tiempo de reposo	Muestra	Ensayo #1	Ensayo #2	Ensayo #3	\bar{X}	C.V
2.0 horas	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.70%	0.97%
	2	102.0%	102.0%	104.0%		
	3	102.0%	104.0%	104.0%		
1.5 horas	1	102.0%	102.0%	104.0%	102.40%	0.86%
	2	102.0%	102.0%	102.0%		
	3	102.0%	104.0%	102.0%		
1.0 hora	1	102.0%	102.0%	102.0%	102.70%	1.06%
	2	102.0%	102.0%	102.0%		
	3	104.5%	104.0%	104.0%		

Coefficiente de variación global: 0.92%

EVALUACION DE RESULTADOS ANALITICOS

1. De acuerdo al tiempo de reposo previo a la incubación se concluye que en el intervalo de tiempo establecido dentro de la validación de 1.0, 1.5 y 2.0 horas. Se logra observar una moderada diferencia en el tamaño de los halos entre 1.0 y 1.5 horas, en cambio de 1.5 á 2.0 horas la diferencia es mínima y poco perceptible a simple vista. Por lo tanto el tiempo establecido como tiempo de reposo previo a la incubación es de 1.5 horas. Con ello se prueba la robustez del método.
2. En cuanto a la variación de los resultados entre diferentes analistas, se observa que estos no distan significativamente uno de otro, aun cuando el tercer analista se encontraba en fase de capacitación, con lo que se cumple la repetibilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos y con ello la del método mismo. Así como también el tercer analista queda capacitado para realizar la prueba de potencia así como su respectiva validación.
3. El rango concentración del analito (estándar de trabajo de lincomicina HCl) para la cual ha sido demostrada una correcta precisión, exactitud y linealidad es del 75, 100 y 125%. Siendo a las tres concentraciones antes mencionadas los resultados satisfactorios. En cambio a concentraciones del 50 y 150% las cuales eran incluidas en el protocolo de validación desde un principio, se obtuvieron valores que no se encontraban dentro de la curva de calibración, por lo tanto fueron anuladas del ensayo.
4. Finalmente la modificación sufrida por la curva de calibración de acuerdo a las alícuotas descritas en el CFR y las tomadas de acuerdo a la calibración de la bureta utilizada , proporciona una leve diferencia dentro de los resultados obtenidos, con lo cual se establece como validadas las alícuotas descritas en los informes técnicos.

Por lo descrito anteriormente se da por aceptada la validación de la técnica de análisis microbiológica cilindro-placa de la USP XX para determinar la potencia de lincomicina 600mg/2mL.

EVALUACION DE RESULTADOS ANALITICOS

a) Linealidad del estándar.

Tabla N° 15 Parámetros de linealidad del estándar

Concentración de principio activo	Rango lineal	Regresión lineal	Desviación de la ordenada
75%	77.7% - 83.6%	$Y = 0.118X + 0.69$	0.69
100%	79.0% - 83.1%	$Y = 0.082X + 0.7287$	0.7287
125%	78.3% - 83.9%	$Y = 0.112X + 0.698$	0.698

b) Precisión del método.

Tabla N° 16 Resultados globales para precisión del método

Muestra		Desviación estándar	Coficiente de variación
Placebo		0.97%	0.95%
Producto terminado	Lote 04050181	2.0 hrs	1.24%
		1.5 hrs.	1.13%
		1.0 hr.	1.48%
	Lote 04050201	2.0 hrs	1.39%
		1.5 hrs.	1.37%
		1.0 hr.	1.45%

C) Exactitud del método

Porcentaje de recobro: del 96.7 al 104.4 %.

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN


Resumén del proceso de validación.

Para determinar la linealidad, exactitud y rango del método se utilizó una serie de tres estándares de trabajo de lincomicina HCl con concentraciones de 75, 100 y 125% de principio activo. Realizando tres ensayos consecutivos por un solo analista, durante tres días diferentes.

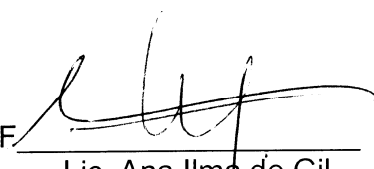
Para el ensayo de precisión del método se realizarón tres enayos en un placebo de la solución inyectable, durante tres dias diferentes y por un solo analista. Asi como también se utilizó producto terminado procedente de dos lotes de lincomicina 600mg/2 mL, donde cada lote fue analizado por tres analistas diferentes, quienes realizarón tres ensayos en cada uno, dejando un tiempo de reposo previo a la incubación de 1, 1.5 y 2.0 horas.

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método microbiológico cilindro-placa para determinar la potencia de lincomicina HCl, contenido en la USP XX **CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES ESTABLECIDAS EN EL PLAN DE VALIDACIÓN.** Por esa razón se seguira siendo utilizando en el laboratorio de microbiología de Corporación Bonima S.A de C.V a pesar que la farmacopea en su edición actual ya no lo considera oficial.

F 

Lic. Aida de Gutierrez
Jefe de laboratorio de
Microbiología

F 

Lic. Ana Ilma de Gil
Gerente de Control de Calidad

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN

La validación se realizó según puntos establecidos del protocolo de validación, siendo los resultados los siguientes:

Tabla N° 17 Reporte de resultados globales

Parámetro	Especificación	Resultado	Dictamen
a) Determinación de linealidad y rango	$r \geq 0.99$	$r = 0.998045$	cumple
b) Precisión	C.V no mayor al 5%	0.95%	cumple
b.1) Repetibilidad y reproducibilidad en placebo.			
b.2) Reproducibilidad, repetibilidad y robustez en producto terminado	C.V no mayor al 5%	Lote 1: 1.00% Lote 2 : 0.93%	cumple
c) Exactitud: recobro.	C.V no mayor al 5% $r \geq 0.99$ % recobro entre 95-105%	CV 75%: 1.8% CV 100%: 1.1% CV 125%: 0.7% $r = 0.998045$ 96.7 – 104.4%	cumple

Ver:

Calibración de equipos involucrados: informe técnico pág. 59,
Cuadro N° 13

Hoja de finalización de fase de capacitación de tercer analista. (Anexo 16)

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La validación de métodos microbiológicos es totalmente diferente a la validación de un método químico o instrumental. Ya que estos presentan un mayor grado de dificultad, porque implican características que no pueden ser estandarizadas, por utilizar microorganismos vivos. Por lo tanto el rango de error es mucho más amplio. A consecuencia de ello la Farmacopea trata de cambiar a métodos más exactos como los químicos e instrumentales debido a la rapidez con que se realizan y a su exactitud.
2. En la determinación de potencia microbiológica, los factores que más influyen en la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados son los analistas, la calidad de la cepa y su mantenimiento, el tiempo de escurrimiento de las pipetas y el tiempo de reposo previo a la incubación, Parámetros evaluados en la precisión del método, cuyos resultados entran en el grado de aceptación del método según farmacopea.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos al introducir distintas variables al método analítico, para determinar la robustez, se concluye que bajo las condiciones analizadas se obtuvieron resultados suficientemente exactos según especificaciones establecidas por farmacopea, de manera que se comprobó que el procedimiento funciona

confiablemente; Ya que modificaciones pequeñas deben afectar muy poco o nada el resultado final del análisis.

4. Parámetros de aptitud del sistema como precisión, adecuabilidad y linealidad del sistema, según la Farmacopea son necesarios bajo el concepto de que el equipo, sistema electrónico, operaciones analíticas y muestras, constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. En el caso de potencia de antibióticos bajo métodos microbiológicos este concepto no aplica. Los parámetros que influyen en ella (repetibilidad y reproducibilidad), son evaluados en la precisión y robustez del método y serán incluidos en la técnica del mismo.
5. Se determino como rango de trabajo concentraciones del 75 al 125%, ya que ese es el intervalo entre el nivel mas bajo y mas alto de concentraciones que ha sido demostrado que puede ser determinadas con la precisión y exactitud requerida para esa matriz.
6. La estabilidad analítica de la muestra no pudo ser ensayada, debido a que el placebo y soluciones estándar del principio activo son de preparación reciente, de acuerdo a especificaciones de la USP, la cual no da instrucciones para su almacenamiento e indica que deben de descartarse las soluciones el mismo día de su preparación.

7. En el laboratorio de microbiología de Corporación Bonima, la metodología planteada ha sido utilizada desde 1980 cuando esta era oficial, y los resultados a través del tiempo no presentan ninguna variación. Por lo tanto se confirma que el método cumple con los requerimientos particulares para su uso propuesto.
8. De acuerdo a los resultados obtenidos durante todo el proceso de validación, se concluye que el método analítico cilindro-placa como herramienta de análisis para lincomicina clorhidrato posee linealidad, precisión, exactitud y rango. Por lo tanto se da como validado.
9. La comparación entre el método microbiológico cilindro-placa y el método cromatografía de gases, que es el método oficial actualmente, no pudo ser realizado ya que no se cuenta con los reactivos y columnas cromatográficas especificadas y sobre todo no se cuenta con un presupuesto para dicho fin.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

8.0 RECOMENDACIONES

1. Que los analistas sean altamente capacitados, para minimizar los riesgos que puedan afectar los resultados. Ya que de ello depende el éxito o fracaso del análisis. Debido a que en la determinación de potencia de antibióticos existen puntos críticos tanto en la parte fisicoquímica como en la microbiológica.
2. Se sugiere que las placas inoculadas sean dejadas en reposo por un tiempo mínimo de 1.5 a 2.0 horas, de acuerdo a los tiempos de reposo previo a la incubación que fueron ensayados durante el desarrollo de la robustez del método, para que de esta manera se obtengan halos con mayor definición, que faciliten el proceso de lectura de los mismos.
3. Aplicar a los análisis cuantitativos los tiempos de escurrimiento de las pipetas que proporciona el fabricante sirve para garantizar un análisis mas exacto, evitando así pérdidas de principio activo al depositar las alícuotas.
4. Hacer la comparación de este método con la cromatografía de gases, la que es oficial actualmente en la USP. Para tener un estudio mas

completo sobre la validación del método cilindro-placa para el antibiótico lincomicina.

5. El empleo del método cilindro-placa ya que es una alternativa para aquellos laboratorios que desean realizar análisis de contenido de antibióticos y que no cuentan con el equipo que exigen los actuales métodos farmacopéicos vigentes. Ya que es un poco más económico en comparación a los métodos instrumentales, donde se debe tomar en cuenta los reactivos, las columnas cromatográficas y sobre todo el mantenimiento del equipo, lo que incrementa el costo del análisis.
6. Se debe tomar en cuenta que cuando se trate de antibióticos cuyo método de análisis ha sufrido alguna modificación o ha sido sustituido por otro, es necesario someterlo a un proceso de validación, que avale la vigencia de este método.

Bibliografía

1. Agreda Rodríguez, D. R. “Comparación de un Método Físico-Químico con el Método Microbiológico para la Cuantificación del Estolato de Eritromicina en Jarabe”, Trabajo de Graduación Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 1979.
2. Broca, T.D y otros. “Microbiología”, 4ª edición. México DF. Programas Educativos S.A. de C.V. 1992, pág. 248.
3. Castro, Gascón y otros. “Validación de Métodos Analíticos”. 1ª edición. España, Asociación Española de Farmacéuticos de la industria. 1998, Pág. 4-55.
4. CFR (Code of Federal Regulations). Título 21. Washington, EUA. The Office of Federal Register National Archives and Records Administration. 1991, Parte 300 a 499. Pág. 298-304.
5. EURACHEM. “El Propósito de Los Métodos Analíticos”. Una guía de laboratorio para la validación de métodos y asuntos relacionados, 1998.
6. Franco M. A. “Validación Analítica para Análisis de Potencia de Antibióticos por Métodos Microbiológicos”, Programa de pasantías, Republica Dominicana. 1998.
http://www.rec.uba.ar/vicerrec/foar/v_f_rep.%20dominicana.htm
7. Garay Bernal, M. M. “Principios Básicos para Validar Procesos Farmacéuticos no Estériles.” Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador. 2001.

8. Grande Luna M. y otros. "Validación de Procedimientos Analíticos Para la Determinación de Iones Sulfatos y Nitratos en Muestras de Agua Potable ", Trabajo de graduación. Facultad de Química , Farmacia y Biología, Universidad Alberto Masferrer, El Salvador, 2003.
9. Ministerio de Salud de Costa Rica, "Guía de Validación," <http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf> Consultada el 15 de agosto de 2006
10. INTERPHARM, "Military Standard 105 E, sampling procedures and tables for inspection by attributes". The interpharm group of companies, IL, USA.1989.
11. Organismo Argentino de Acreditación (OAA), "Guía de validación de métodos de ensayo", Buenos Aires, Argentina.2003
12. United States Pharmacopeial Convention, inc. "The United States Pharmacopeia". 20 ed. Washington D.C. EUA. 1980, Pág. 882-888.
13. United States Pharmacopeial Convention, inc. "The United States Pharmacopeia". 25 ed. and The National Formulary 20 ed. Washington D.C. EUA. 2002, Pág. 2256-2259.
14. United States Pharmacopeial Convention, inc. "The United States Pharmacopeia". 27 ed. and The National Formulary 22 ed. Washington D.C. EUA. 2004, Pág. 2622-2625. Pág. 250-254.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Elementos requeridos para ensayos de validación Según USP 27. ⁽¹⁴⁾

Características de funcionamiento analítico	Ensayo categoría I	Ensayos categoría II		Ensayo categoría III	Ensayo categoría IV
		Cuantitativo	Prueba limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Limite de detección	No	No	Si	*	No
Limite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	*	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

* Puede que se requiera, depende de la naturaleza de la prueba.

ANEXO N° 2

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

Área: Microbiología.

Fundamento de la validación: Validación de tipo concurrente.

- i. .Justificación: Método utilizado como oficial hasta 1980, por la USP XX. La cual era vigente en ese momento. Este método se sigue utilizando a pesar que a partir de la USP XXI el método fue sustituido.
- ii. .Descripción: La validación del método fue desarrollado determinando las pruebas que la USP 27 asigna para la categoría I que corresponde a pruebas de contenido: linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad y robustez), exactitud y rango.
- iii. Fechas de la validación: Fecha de inicio: Mayo/2005
Fecha final: Octubre/2005
- iv. Responsables:
Analistas: Lic. Brenda Mejía / Lic. Saúl Soriano /
Silvia Muñoz.
Jefe laboratorio de microbiología: Lic. Aída de
Gutiérrez.
Gerente de control de calidad: Lic. Ana Ilma de Gil.

Analistas: _____
Lic. Brenda Mejía. Lic. Saúl Soriano.

Silvia Muñoz.

Aprobado: _____
Lic. Aída de Gutiérrez Lic. Ana Ilma de Gil.

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

Área: Microbiología.

v. Parámetros a estudiar-frecuencia / especificación:

Parámetro	Especificación	Reporte
<p>a) <u>Linealidad y rango del estándar</u></p> <p><u>Ensayo previo:</u> Preparar una serie de cinco estándares de trabajo de lincomicina HCl, con concentraciones crecientes: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. Realizar en tres días diferentes.</p>	<p>coeficiente de correlación ≥ 0.99</p>	<p>Rango lineal</p> <p>Regresión lineal</p> <p>Coeficiente de correlación</p> <p>Desviación de la ordenada al origen</p>
<p>b) <u>Precisión del método: repetibilidad, reproducibilidad y robustez.</u></p> <p>1. <u>En placebo</u> A un placebo de la solución inyectable adicionarle estándar a concentración del 100% de principio activo. Realizar en tres días diferentes.</p> <p>2. <u>En producto terminado</u> Realizar ensayos a muestras de dos lotes diferentes de lincomicina HCl solución inyectable. Realizar en tres días diferentes. Por dos analistas diferentes. Para ambos casos cada analista utilizará los tiempos de escurrimiento permitidos por el fabricante de las pipetas según sea el caso</p>	<p>Coeficiente de variación no debe ser mayor al 5%</p> <p>Coeficiente de variación no debe ser mayor al 5%</p>	<p>Desviación estándar</p> <p>Coeficiente de variación</p> <p>Desviación Estándar</p> <p>Coeficiente de Variación</p>

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO ANALITICO

Fecha de elaboración: 2004/09/01

Objetivo: Método microbiológico cilindro placa según USP XX para la determinación de potencia de lincomicina HCl.

Área: Microbiología.

Parámetro	Especificación	Reporte
<p>- Determinación De precisión en producto terminado:</p> <p>* Realizado por dos analistas, con el cuidado que cada ensayo individual sea incubado en el mismo nivel de la incubadora, con su respectiva curva.</p> <p>* Cada uno de los analistas hará los tres ensayos dejando en reposo previo a la incubación (después de haber inoculado los cilindros) por: 1 hora, 1.5 horas y 2 horas.</p>	<p>Coeficiente de variación variación no debe ser mayor al 5%</p>	<p>Desviación estándar Coeficiente de variación</p>
<p>c) Exactitud: Recobro Se determinara mediante la linealidad del método. Adicionar concentraciones teóricas conocidas de la matriz para obtener concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%.</p>	<p>Coeficiente de variación variación no debe ser mayor al 5%</p> <p>coeficiente de correlación ≥ 0.99</p> <p>% de recobro debe ser entre 95% - 105%</p>	<p>Rango lineal Promedio de datos Desviación estándar Coeficiente de variación Coeficiente de correlación Regresión lineal Desviación de la ordenada al origen % de recobro</p>

ANEXO N° 3

Preparación de soluciones patrón y diluciones de Prueba de estándares de referencia ⁽¹²⁾

Antibiótico y tipo de ensayo [Cilindro placa (CP) ó Turbidimétrico (T)]	Requerimiento de Secado	Solución stock			Dilución de Prueba	
		Solvente Inicial (Y concentración inicial donde se especifique); [Diluyente siguiente si cambia]	Concentración Final de stock por mL.	Tiempo de vigencia	Diluyente final	Dosis media (µg de actividad o unidades por mL.)
<i>Amikacina (T)</i>	no	agua	1 mg	14 días	agua	10 µg
<i>Amfotericina B (CP)</i>	si	Metil sulfoxido	1 mg	1 días	B.10	1.0 µg
<i>Ampicilina(CP)</i>	no	agua	100 µg	7 días	B.3	0.1 µg
<i>Bacitracina(CP)</i>	si	Acido clorhídrico 0.01 N	100 U	1 días	B.1	1.0 U
<i>Bleomicina(CP)</i>	si	B.16	2 U	14 días	B.16	0.04 U
<i>Candididina(T)</i>	si	Metil sulfoxido	1 mg	1 días	agua	0.06 µg
<i>Capreomicina(T)</i>	si	agua	1 mg	7 días	agua	100 µg
<i>Carbencilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	14 días	B.1	20 µg
<i>Cefazolina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	7 días	B.1	20 µg
<i>Cefalexina(CP)</i>	no	agua	100 µg	7 días	B.4	10 µg
<i>Cefaloglicina(CP)</i>	si	B.1	1 mg	5 días	B.1	1.0 µg
<i>Cefaloridina(CP)</i>	si	B.1	1 mg	5 días	B.1	1.0 µg
<i>Cefalotina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	5 días	B.1	1.0 µg
<i>Cefapirina(CP)</i>	no	B.6 (10mg/mL);[B.1]	1 mg	5 días	B.1	1.0 µg
<i>Cefradina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	5 días	B.1	10 µg
<i>Cloranfenicol(T)</i>	no	Alcohol (10mg/mL);[agua]	1 mg	30 días	agua	2.5 µg
<i>Clortetraciclina(T)</i>	no	Acido clorhídrico 0.01 N	1 mg	4 días	agua	0.06 µg
<i>Clindamicina(CP)</i>	no	agua	1 mg	30 días	B.3	1.0 µg
<i>Cloxacilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	7 días	B.1	5.0 µg
<i>Collistimetato de sodio(CP)</i>	si	agua (10 mg/mL);[B.6]	1 mg	1 días	B.6	1.0 µg
<i>Colistina(CP)</i>	si	agua (10 mg/mL);[B.6]	1 mg	14 días	B.6	1.0 µg
<i>Cicloserina(T)</i>	si	agua	1 mg	30 días	agua	50 µg
<i>Dactinomicina(CP)</i>	si	Metanol (10 mg/mL);[B.3]	1 mg	90 días	B.3	1.0 µg
<i>Demeclociclina(T)</i>	si	Acido clorhídrico 0.1 N	1 mg	4 días	agua	0.1 µg
<i>Dicloxacilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	7 días	B.1	5.0 µg
<i>Dihidroestreptomicina(CP)</i>	si	B.3	1 mg	30 días	B.3	1.0 µg
<i>Doxiciclina(T)</i>	no	Acido clorhídrico 0.1 N	1 mg	5 días	agua	0.1 µg
<i>Eritromicina(CP)</i>	si	Metanol (10 mg/mL);[B.3]	1 mg	14 días	B.3	1.0 µg
<i>Gentamicina(CP)</i>	si	B.3	1 mg	30 días	B.3	0.1 µg
<i>Gramicidina(T)</i>	si	Alcohol 95%	1 mg	30 días	Alcohol 95%	0.04 µg
<i>Kanamicina(T)</i>	no	agua	1 mg	30 días	agua	10 µg
<i>Kanamicina B(CP)</i>	no	B.3	1 mg	30 días	B.3	1.0 µg
<i>Lincomicina(CP)</i>	no	agua	1 mg	30 días	B.3	2.0 µg
<i>Metaciclina(T)</i>	si	agua	1 mg	7 días	agua	0.06 µg
<i>Meticilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	4 días	B.1	10 µg
<i>Minociclina(T)</i>	no	Acido clorhídrico 0.1 N	1 mg	2 días	agua	0.1 µg
<i>Mitramicina(CP)</i>	si	agua	100 µg	1 días	B.1	1.0 µg
<i>Mitomicina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	14 días	B.1	1.0 µg
<i>Nafcilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	2 días	B.1	2.0 µg
<i>Neomicina B(CP)</i>	si	B.3	1 mg	14 días	B.3	1.0 µg
<i>Novobiocina(CP)</i>	si	Alcohol (10mg/mL);[B.3]	1 mg	5 días	B.6	0.5 µg
<i>Nistatina(CP)</i>	si	Dimetilformamida	1,000 U	el mismo día	B.6	20 U
<i>Oxacilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	3 días	B.1	5.0 µg
<i>Oxitetraciclina(T)</i>	no	Acido clorhídrico 0.1 N	1 mg	4 días	agua	0.24 µg
<i>Paromomicina(CP)</i>	si	B.3	1 mg	21 días	B.3	1.0 µg
<i>Penicilina G(CP)</i>	no	B.1	1,000 U	2 días	B.1	1.0 U
<i>L-penicilina(CP)</i>	no	agua	1,000 U	7 días	B.3	0.1 U
<i>Polimixina B(CP)</i>	si	agua:[B.6]	10,000 U	14 días	B.6	10 U
<i>Rifanpin(CP)</i>	no	Metanol	1 mg	1 días	B.1	5.0 µg
<i>Rolitetraciclina(T)</i>	si	agua	1 mg	1 días	agua	0.24 µg
<i>Espectinomomicina(T)</i>	no	agua	1 mg	30 días	agua	30 µg
<i>Estreptomicina(T)</i>	si	agua	1 mg	30 días	agua	30 µg
<i>Tetraciclina(T)</i>	no	Acido clorhídrico 0.1 N	1 mg	1 días	agua	0.24 µg
<i>Ticarcilina(CP)</i>	no	B.1	1 mg	1 días	B.1	5.0 µg
<i>Tobramicina(T)</i>	no	agua	1 mg	14 días	agua	2.5 µg
<i>Vancomicina(CP)</i>	si	agua	1 mg	7 días	B.4	10 µg
<i>Viomicina(T)</i>	si	agua	1 mg	7 días	agua	100 µg

ANEXO N° 4

Microorganismos de prueba para ensayos de antibióticos ⁽¹²⁾

Antibiótico	Microorganismo de prueba	Numero ATCC
<i>Amikacina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Amfotericina B</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763
<i>Ampicilina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Bacitracina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	10240
<i>Bleomicina</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607
<i>Candidicina</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763
<i>Capreomicina</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
<i>Carbenicilina</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619
<i>Cefazolina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefalexina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefaloglicina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefaloridina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefalotina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefapirina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cefradina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Cloranfenicol</i>	<i>Escherichia coli</i>	10536
<i>Clortetraciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Clindamicina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Cloxacilina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Colistimetato de sodio</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
<i>Colistina</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
<i>Cicloserina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Dactinomicina</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Demeclociclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Dicloxacilina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Dihidroestreptomicina</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Doxiciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Eritromicina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Gentamicina</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Gramicidina</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	10541
<i>Kanamicina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Kanamicina B</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Lincomicina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Metaciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Metilicina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Minociclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Mitramicina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Mitomicina</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Nafcilina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Neomicina B</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Novobiocina</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Nistatina</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601
<i>Oxacilina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Oxitetraciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Paromomicina</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Penicilina G</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>D-penicilina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>L-penicilina</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Polimixina B</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617
<i>Rifampin</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Rolitetraciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Espectinomicina</i>	<i>Escherichia coli</i>	10536
<i>Estreptomicina</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
<i>Tetraciclina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Ticarcilina</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29336
<i>Tobramicina</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Vancomicina</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Viomicina</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031

ANEXO N° 5

Preparación del inóculo ⁽¹²⁾

Microorganismo de prueba y ATCC	condiciones de incubación			Dilución de la suspensión madre para obtener el 25% de transmitancia	Composición sugerida para el inóculo		
	medio	Temp. (o)	tiempo		medio	cantidad (mL por 100 mL)	Antibiótico ensayado
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	1	32 - 35	24 hr.	según sea	2	0.1	Rifampin
				determinado			Dactomicina,
	32	32 - 35	5 días		5	según se requiera	Dihidroestreptomocina,
					8	0.5	Canamicina B
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (4617)					8	según se requiera	Mitomocina
							Vancomocina
<i>Escherichia coli</i> (10536)	1	32 - 35	24 hr.	1:20	10	0.1	Colistimetato de Sodio, Colistina, Poliomixina B
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	1	32 - 35	24 hr.	1:20	3	0.7	Cloranfenicol
						0.1	Espectinomocina
<i>Micrococcus luteus</i> (9341)	1	32 - 35	24 hr.	1:25	3	0.05	Capreomicina
						0.1	Estreptomocina, Viomicina
<i>Micrococcus luteus</i> (10240)	1	32 - 35	24 hr.	1:40	11	0.5	Ampicilina, Peneticilina
					11	1.5	Clintamicina, Eritromocina, Lincomocina
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (607)	1	32 - 35	24 hr.	1:35	1	0.3	Bacitracina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (25619)	36	37	48 hr.	según sea	35	1.0	Bleomicina
				determinado			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (29336)	1	37	24 hr.	1:25	10	0.5	Carbenicilina
	36	37	24 hr.	1:50	38	1.5	Ticarcilina
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (9763)	19	32 - 35	24 hr.	según sea	13	0.2	Candidicina
				determinado			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2601)	Alternativamente						
	13	37	16 - 18 hr.				
<i>Staphylococcus aureus</i> (29737)	19	30	48 hr.	1:30	19	1.0	Anfotericina B
	19	30	48 hr.	1:30	19	1.0	Nistatina
<i>Staphylococcus aureus</i> (29737)	1	32 - 35	24 hr.	1:20	1	0.05	Cefasolina, Cefalexina, Cefradina
					1	0.1	Cefaloridina, Cloxacilina, Dicloxacilina
					1	0.2	Cefaloglicina
					1	0.3	Nafcilina, Oxacilina
					1	1.0	Penicilina G
					3	0.1	Amikasina, Clortetraciclina, Demeclociclina, Doxiciclina, Metaciclina, Oxitetraciclina, Rolitetraciclina, Tetraciclina.
					3	0.2	Kanamocina, Minociclina
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)					3	0.4	Cicloserina
					3	0.15	Tobramocina
					8	0.1	Mitramocina
					11	0.4	Neomicina B
					1	4.0	Novobiocina
<i>Streptococcus faecium</i> (10541)	1	32 - 35	24 hr.	1:14	1	4.0	Novobiocina
					11	0.03	Gentamicina
				1:25	11	1.0	Neomicina B
<i>Streptococcus faecium</i> (10541)	3	37	16 - 18 hr.	según sea	11	2.0	Paromomocina
				determinado	3	1.0	Gramicidina

TABLE 1—Sample size code letters

(see 4.9.1 and 4.9.2)

Lot or batch size			Special inspection levels				General inspection levels		
			S-1	S-2	S-3	S-4	I	II	III
2	to	8	A	A	A	A	A	B	
9	to	15	A	A	A	A	B	C	
16	to	25	A	A	B	B	C	D	
26	to	50	A	B	B	C	D	E	
51	to	90	B	B	C	C	E	F	
91	to	150	B	B	C	D	F	G	
151	to	280	B	C	D	E	G	H	
281	to	500	B	C	D	E	H	J	
501	to	1200	C	C	E	F	J	K	
1201	to	3200	C	D	E	G	K	L	
3201	to	10000	C	D	F	G	L	M	
10001	to	35000	C	D	F	H	M	N	
35001	to	150000	D	E	G	J	N	P	
150001	to	500000	D	E	G	J	P	Q	
500001	and	over	D	E	H	K	Q	R	

MIL-STD-105E

ANEXO N° 6

Códigos de letras para determinar el tamaño de la muestra ⁽¹⁰⁾

SINGLE

TABLE II-A—Single sampling plans for normal inspection (Master table)

(see 4.9.3 and 4.9.4)

Sample size code letter	Sample size	Acceptable Quality Levels (normal inspection)																											
		0.010	0.015	0.025	0.040	0.065	0.10	0.15	0.25	0.40	0.65	1.0	1.5	2.5	4.0	6.5	10	15	25	40	65	100	150	250	400	650	1000		
		Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	Ac Re	
A	2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
B	3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
C	5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
D	8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
E	13	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
F	20	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
G	32	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
H	50	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
J	80	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
K	125	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
L	200	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
M	315	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
N	500	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
P	800	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
Q	1250	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
R	2000	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		

MIL-STD-105E

Plan de inspección simple para una muestra normal (10)

ANEXO N° 7

- ↓ = Use first sampling plan below arrow. If sample size equals, or exceeds, lot or batch size, do 100 percent inspection.
- ↑ = Use first sampling plan above arrow.
- Ac = Acceptance number.
- Re = Rejection number.

ANEXO N° 8

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología				DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS RESULTADOS Y CALCULOS DE MUESTRA								
ENSAYO N° _____			FECHA ANALISIS: _____ HORA INICIO DE INCUBACIÓN: _____			FECHA LECTURA: _____ HORA FINAL DE INCUBACIÓN: _____			TOTAL DE HORAS INCUBADAS: _____			
NOMBRE DE LA MUESTRA: _____				OF: _____		LOTE: _____						
DILUCIONES DE LA MUESTRA:												
FD = _____												
MUESTRA	LECTURAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	X	DIFERENCIA ($X_M - X_{ST}$)
1	ESTANDAR											
	MUESTRA											
2	ESTANDAR											
	MUESTRA											
3	ESTANDAR											
	MUESTRA											
DIÁMETRO DE HALOS DE LA MUESTRA CORREGIDOS PARA INTERPOLAR EN LA LINEA DOSIS - RESPUESTA: $C+(X_M - X_{ST})$												
1				2				3				
CALCULO DE CONTENIDO:												
CALCULOS REALIZADOS EN BASE A LA LINEA DOSIS - RESPUESTA DE: _____												
OBSERVACIONES: _____												
ANALISTA: _____ FECHA: _____ Vo.Bo.: _____												

Figura N° 4. Promedios y cálculos de potencia para la muestra

ANEXO N° 9

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología	DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS CALCULOS DE LA LINEA DOSIS - RESPUESTA																												
Fecha de análisis: _____ Estándar: _____ Lote: _____ Vence: _____ Valoración: _____ PESO TEORICO = _____ PESO REAL = _____ CONCENTRACION TEORICA FINAL DEL ESTANDAR = _____ CONCENTRACION REAL FINAL DEL ESTANDAR = _____ <p style="text-align: center;"> Ajuste en la alícuota: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> </p> <p style="text-align: center;"> Ejemplo de cálculo: Para el punto "C" de concentración µg/mL </p> <table style="width: 100%; border: none;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center; border: none;">Línea Dosis-Respuesta teórica</th> <th colspan="2" style="text-align: center; border: none;">Línea Dosis-Respuesta real</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center; border: none;">Alícuota (mL)</th> <th style="text-align: center; border: none;">Concentración (mcg/mL)</th> <th style="text-align: center; border: none;">Alícuota (mL)</th> <th style="text-align: center; border: none;">Concentración (mcg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border: none;">a) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> <td style="border: none;">a) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">b) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> <td style="border: none;">b) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">c) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> <td style="border: none;">c) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">d) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> <td style="border: none;">d) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">e) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> <td style="border: none;">e) _____</td> <td style="border: none;">_____</td> </tr> </tbody> </table> Analista: _____ Fecha: _____ VoBo.: _____		Línea Dosis-Respuesta teórica		Línea Dosis-Respuesta real		Alícuota (mL)	Concentración (mcg/mL)	Alícuota (mL)	Concentración (mcg/mL)	a) _____	_____	a) _____	_____	b) _____	_____	b) _____	_____	c) _____	_____	c) _____	_____	d) _____	_____	d) _____	_____	e) _____	_____	e) _____	_____
Línea Dosis-Respuesta teórica		Línea Dosis-Respuesta real																											
Alícuota (mL)	Concentración (mcg/mL)	Alícuota (mL)	Concentración (mcg/mL)																										
a) _____	_____	a) _____	_____																										
b) _____	_____	b) _____	_____																										
c) _____	_____	c) _____	_____																										
d) _____	_____	d) _____	_____																										
e) _____	_____	e) _____	_____																										

Figura N° 5. Cálculo de la línea dosis-respuesta

ANEXO N° 10

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología		DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS METODO CILINDRO PLACA RESULTADOS DE LA CURVA ESTANDAR	
NOMBRE DEL ESTANDAR: _____		<input type="checkbox"/> ESTANDAR DE TRABAJO	
LOTE/CL: _____	VENCE: _____	<input type="checkbox"/> ESTANDAR DE REFERENCIA USP	
POTENCIA: _____	FECHA: _____	<input type="checkbox"/> WORKING ESTÁNDAR	
MICROORGANISMO DE PRUEBA: _____		TRANSMITANCIA: _____	
FECHA OBTENCION SUSPENSION: _____		ENSAYO N° _____	
LECTURA			
DIAMETRO DE HALOS DE INHIBICION (mm)			
ESTANDAR (C)	ESTANDAR (A)	ESTANDAR (C)	ESTANDAR (B)
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
		PROMEDIO	_____
ESTANDAR (C)	ESTANDAR (D)	ESTANDAR (C)	ESTANDAR (E)
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
		PROMEDIO	_____
LOTE SOLUCION BUFFER pH 8.0: _____		LOTE MEDIO 11 (BASE, INOCULO) : _____	
INFORMACION PARA GRAFICAR: _____		OBSERVACIONES: _____	
L= _____ mm	[] = _____ mcg/mL	ANALISTA: _____ Vo. Bo. _____	
H= _____ mm	[] = _____ mcg/mL		
PROMEDIO PUNTO CENTRAL CALCULADO: _____			
PROMEDIO PUNTO CENTRAL GRAFICADO: _____			
FORMATO VIGENTE A PARTIR DEL 7 DE OCTUBRE DE 2003			

Figura N° 6. Resultado de los diámetros de curva de calibración

ANEXO N° 11

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología	HOJA DE CALCULO		
CALCULO DE DIAMETRO PROMEDIO DE HALOS DE LA CONCENTRACION MEDIA DEL ESTANDAR			
$c = \frac{\quad + \quad + \quad + \quad}{4}$ $c = \underline{\hspace{10em}}$			
DIAMETRO PROMEDIO CORREGIDO PARA EL ESTANDAR A LAS CONCENTRACIONES A, B, D, E $[(c - X_c) + X_i]$			
(A) - _____ a = _____	(B) - _____ b = _____	(D) - _____ d = _____	(E) - _____ e = _____
$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$ $L = \frac{\quad}{5}$ $L = \frac{\quad}{5}$ $L = \quad$		$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$ $H = \frac{\quad}{5}$ $H = \frac{\quad}{5}$ $H = \quad$	
RESPONSABLE: _____		FECHA: _____	
SIMBOLOGIA UTILIZADA:			
C = Diámetro Promedio (mm) de 36 lecturas de los halos obtenidos con la Solución Estándar de concentración media. a,b,d,e = Diámetros Promedio (mm) corregidos para las concentraciones más bajas y más altas del estándar respectivamente. L = Diámetro de Halos (mm) calculado para la concentración más baja de la gráfica de respuesta. H = Diámetro de Halos (mm) calculado para la concentración más alta de la gráfica de respuesta. i = Estándar a, b, c ó d respectivamente. X = Promedio de Halos de inhibición (mm)			
FORMATO VIGENTE A PARTIR DEL 7 DE OCTUBRE DE 2003			

Figura N° 7. Cálculo de máxima y mínima zona de inhibición

ANEXO N° 12

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología		DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS	
RESULTADOS			
ENSAYO N°: _____		OF: _____	
PRODUCTO/M.P. _____		FECHA DE ANALISIS: _____	
LOTE/CONTROL: _____			
POTENCIA DE ANTIBIOTICOS METODO CILINDRO PLACA			
N° DE MUESTRA	%	MEDIA Y COEFICIENTE DE VARIACION OBTENIDOS	
1			
2			
3			
ESPECIFICACION OFICIAL: _____			
OBSERVACIONES: _____			
ANALISTA: _____		Vo.Bo.: _____	
FECHA DE EMISION: _____			

Figura N° 8. Cálculo de media y coeficiente de variación del ensayo

ANEXO N° 13

Esquema de diluciones para estándar y muestra

Preparación del Estándar

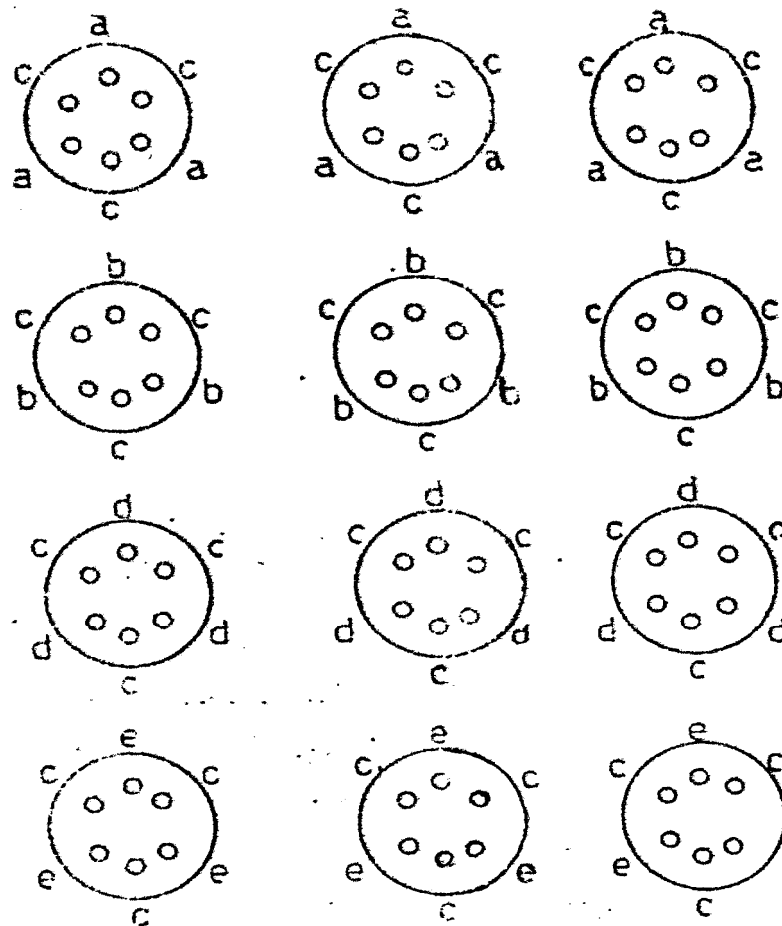
Peso de
Estándar \equiv 25.0 mg agua purificada estéril 25.0 mL
↓
5.0 mL Buffer N°3 50.0 mL
↓
5.0 mL Buffer N°3 50.0 mL
(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Preparación de la muestra

Alícuota \equiv 996 mg agua purificada estéril 200.0 mL
↓
2.0 mL Buffer N°3 50.0 mL
↓
1.0 mL Buffer N°3 100.0 mL
(1.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

ANEXO N° 14

Preparación de las placas para la línea dosis-respuesta



Preparación de la muestra

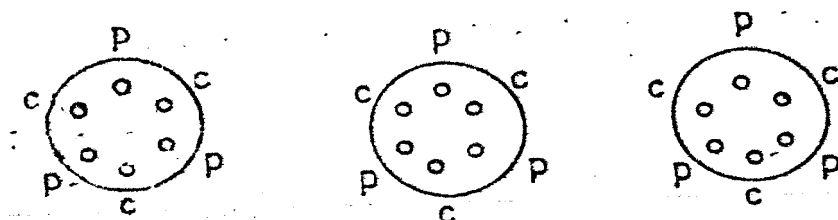


Figura N° 9 Preparación de las placas para inoculación de estándar y

muestras ⁽¹⁾

ANEXO N° 15

HOJA DE FINALIZACIÓN DE ETAPA DE CAPACITACIÓN

Departamento / Sección: Control de calidad / Microbiología

Capacitador: Silvia Carolina Muñoz Francés

Capacitado: Saúl Ernesto Soriano Rodríguez.

Tema: Determinación de potencia de antibióticos mediante el método microbiológico cilindro-placa.

Fecha de inicio: 2005-05-17

Fecha de finalización: 2005-10-07

No horas: 300 horas.

Conclusión:

De acuerdo a resultados obtenidos, se da por concluida la etapa de capacitación del Lic. Saúl Soriano, con lo que queda autorizado para efectuar dicho análisis, así como también posteriores validaciones involucradas con el mismo.

F

Lic. Aída de Gutierrez
Jefe de laboratorio de
Microbiología

E

Silvia Muñoz
Capacitador

F

Lic. Saúl Soriano

ANEXO N° 16

Tabla t de student ⁽³⁾

α ν	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	6.314	12.706	25.482	63.657		
2	2.920	4.303	6.205	9.925	14.069	31.598
3	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	2.132	2.776	3.495	4.604	5.908	8.610
5	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317	5.959
7	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	1.860	2.306	2.782	3.355	3.832	5.041
9	1.833	2.262	2.735	3.250	3.690	4.781
10	1.812	2.228	2.694	3.189	3.581	4.587
11	1.796	2.201	2.663	3.146	3.497	4.437
12	1.782	2.179	2.640	3.108	3.428	4.318
13	1.771	2.160	2.623	3.074	3.372	4.221
14	1.761	2.145	2.610	3.042	3.326	4.140
15	1.753	2.131	2.599	3.012	3.286	4.073
16	1.746	2.120	2.589	2.984	3.252	4.015
17	1.740	2.110	2.580	2.958	3.222	3.965
18	1.734	2.101	2.573	2.934	3.197	3.922
19	1.729	2.093	2.567	2.911	3.174	3.883
20	1.725	2.086	2.562	2.890	3.153	3.850
21	1.721	2.080	2.557	2.870	3.135	3.819
22	1.717	2.074	2.553	2.851	3.119	3.792
23	1.714	2.069	2.549	2.833	3.104	3.767
24	1.711	2.064	2.545	2.816	3.090	3.745
25	1.708	2.060	2.542	2.800	3.078	3.725
26	1.706	2.056	2.539	2.785	3.067	3.707
27	1.703	2.052	2.536	2.771	3.056	3.690
28	1.701	2.048	2.533	2.758	3.047	3.674
29	1.699	2.045	2.531	2.746	3.038	3.659
30	1.697	2.042	2.529	2.735	3.030	3.646
35	1.690	2.030	2.524	2.724	3.006	3.591
40	1.684	2.021	2.520	2.704	2.971	3.551
45	1.680	2.014	2.518	2.690	2.952	3.520
50	1.676	2.008	2.516	2.678	2.937	3.496
55	1.673	2.004	2.514	2.669	2.925	3.476
60	1.671	2.000	2.513	2.660	2.915	3.460
70	1.667	1.994	2.511	2.648	2.899	3.435
80	1.665	1.989	2.510	2.638	2.887	3.416
90	1.662	1.986	2.509	2.631	2.878	3.402
100	1.661	1.982	2.508	2.625	2.871	3.390
120	1.658	1.980	2.507	2.617	2.860	3.373
Ley normal	1.645	1.960	2.241	2.576	2.807	3.291

ANEXO N° 17

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología	DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS CALCULOS DE LA LINEA DOSIS - RESPUESTA																												
Fecha de análisis: <u>2005-06-16</u>																													
Estándar: <u>Lincomicina HCL USP</u>	$\begin{array}{r} 25 \text{ mg} \text{ --- } 88.2\% \\ x \text{ --- } 100\% \\ \hline x = 0.0283 \text{ g} \end{array}$																												
Lote: <u>H2B130</u>																													
Vence: <u>vigente</u>																													
Valoración: <u>88.2%</u>																													
PESO TEORICO = <u>0.0283 g</u>																													
PESO REAL = <u>0.0283 g</u>																													
CONCENTRACION TEORICA FINAL DEL ESTANDAR = <u>10 mcg/ml</u>																													
CONCENTRACION REAL FINAL DEL ESTANDAR = <u>10 mcg/ml</u>																													
Ajuste en la alicuota: SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>																													
Ejemplo de cálculo: Para el punto "C" de concentración µg/mL																													
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <table border="0" style="border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">Línea Dosis-Respuesta teórica</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">Alicuota (mL)</th> <th style="text-align: center;">Concentración (mcg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>a) <u>1.28</u></td><td><u>1.28</u></td></tr> <tr><td>b) <u>1.60</u></td><td><u>1.60</u></td></tr> <tr><td>c) <u>10.00</u></td><td><u>2.00</u></td></tr> <tr><td>d) <u>2.50</u></td><td><u>2.50</u></td></tr> <tr><td>e) <u>8.12</u></td><td><u>8.12</u></td></tr> </tbody> </table> <table border="0" style="border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">Línea Dosis-Respuesta real</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">Alicuota (mL)</th> <th style="text-align: center;">Concentración (mcg/mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>a) <u>1.30</u></td><td><u>1.30</u></td></tr> <tr><td>b) <u>1.60</u></td><td><u>1.60</u></td></tr> <tr><td>c) <u>10.00</u></td><td><u>2.00</u></td></tr> <tr><td>d) <u>2.50</u></td><td><u>2.50</u></td></tr> <tr><td>e) <u>3.15</u></td><td><u>3.15</u></td></tr> </tbody> </table> </div>		Línea Dosis-Respuesta teórica		Alicuota (mL)	Concentración (mcg/mL)	a) <u>1.28</u>	<u>1.28</u>	b) <u>1.60</u>	<u>1.60</u>	c) <u>10.00</u>	<u>2.00</u>	d) <u>2.50</u>	<u>2.50</u>	e) <u>8.12</u>	<u>8.12</u>	Línea Dosis-Respuesta real		Alicuota (mL)	Concentración (mcg/mL)	a) <u>1.30</u>	<u>1.30</u>	b) <u>1.60</u>	<u>1.60</u>	c) <u>10.00</u>	<u>2.00</u>	d) <u>2.50</u>	<u>2.50</u>	e) <u>3.15</u>	<u>3.15</u>
Línea Dosis-Respuesta teórica																													
Alicuota (mL)	Concentración (mcg/mL)																												
a) <u>1.28</u>	<u>1.28</u>																												
b) <u>1.60</u>	<u>1.60</u>																												
c) <u>10.00</u>	<u>2.00</u>																												
d) <u>2.50</u>	<u>2.50</u>																												
e) <u>8.12</u>	<u>8.12</u>																												
Línea Dosis-Respuesta real																													
Alicuota (mL)	Concentración (mcg/mL)																												
a) <u>1.30</u>	<u>1.30</u>																												
b) <u>1.60</u>	<u>1.60</u>																												
c) <u>10.00</u>	<u>2.00</u>																												
d) <u>2.50</u>	<u>2.50</u>																												
e) <u>3.15</u>	<u>3.15</u>																												
Analista: <u>Silvia Muñoz</u>	Fecha: <u>2005-06-21</u>																												
VoBo.: <u>BL</u>																													

Figura N° 10 Ejemplo para el cálculo de potencia de antibióticos

CORPORACIÓN BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología		DETERMINACIÓN DE POTENCIA DE ANTIBIÓTICOS MÉTODO CILINDRO PLACA RESULTADOS DE LA CURVA ESTANDAR	
NOMBRE DEL ESTANDAR: <u>Lidamicino ucl</u>		<input type="checkbox"/> ESTANDAR DE TRABAJO	
LOTE/CL: <u>H26130</u> VENCE: <u>vigente</u>		<input checked="" type="checkbox"/> ESTANDAR DE REFERENCIA USP	
POTENCIA: <u>35.2%</u> FECHA: <u>2005-06-16</u>		<input type="checkbox"/> WORKING ESTANDAR	
MICROORGANISMO DE PRUEBA: <u>Sarcoma L460</u>		TRANSMITANCIA: <u>12.5% T</u>	
FECHA OBTENCIÓN SUSPENSIÓN: <u>2005-06-05</u>		ENSAYO N° <u>96.944.05/2005</u>	
LECTURA			
DIÁMETRO DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
ESTANDAR (C)	ESTANDAR (A)	ESTANDAR (C)	ESTANDAR (B)
16.8	14.6	16.8	15.8
16.8	15.4	16.6	15.8
17.6	15.5	16.6	15.6
16.8	14.8	16.8	15.7
16.8	15.3	17.4	15.5
16.8	14.8	16.7	15.6
16.5	14.5	16.8	15.8
16.6	15.7	16.8	15.7
16.6	15.2	16.6	15.8
16.8	15.1	PROMEDIO 16.8	15.7
ESTANDAR (C)	ESTANDAR (D)	ESTANDAR (C)	ESTANDAR (E)
16.6	17.7	16.8	18.2
16.6	17.6	16.8	18.8
16.8	17.2	16.9	18.6
16.8	17.2	16.8	18.6
17.0	17.4	17.2	18.6
16.6	17.4	16.5	18.8
16.8	17.2	16.6	18.8
16.8	17.4	16.6	18.6
16.8	17.6	16.6	18.8
16.8	17.4	PROMEDIO 16.8	18.6
LOTE SOLUCIÓN BUFFER pH 8.0: <u>2 050518</u>		LOTE MEDIO 11 (BASE, INOCULO): <u>3 050602</u>	
INFORMACIÓN PARA GRAFICAR:		OBSERVACIONES	
L= <u>15.0</u> mm	I= <u>1.30</u> mcg/ml	ANALISTA: <u>Silvia Muñoz</u> Vc. Bc. <u>BL</u>	
H= <u>18.5</u> mm	J= <u>3.15</u> mcg/ml		
PROMEDIO PUNTO CENTRAL CALCULADO: <u>16.8</u>			
PROMEDIO PUNTO CENTRAL GRAFICADO: <u>16.8</u>			
CÓMPUTO VIGENTE A PARTIR DEL 1 DE OCTUBRE DE 2003			

Figura N° 11 Promedios para la línea dosis-respuesta

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología		HOJA DE CALCULO	
CALCULO DE DIAMETRO PROMEDIO DE HALOS DE LA CONCENTRACION MEDIA DEL ESTANDAR			
$c = \frac{16.8 + 16.8 + 16.8 + 16.8}{4}$ $c = 16.8$			
DIAMETRO PROMEDIO CORREGIDO PARA EL ESTANDAR A LAS CONCENTRACIONES A, B, D, E $[(c - X_i) + X_i]$			
$a = \frac{16.8}{16.8} - 0.0 + 15.1$ $a = 15.1$	$b = \frac{16.8}{16.8} - 0.0 + 15.7$ $b = 15.7$	$d = \frac{16.8}{16.8} - 0.0 + 17.4$ $d = 17.4$	$e = \frac{16.8}{16.8} - 0.0 + 18.6$ $e = 18.6$
$L = \frac{3a + 2b + c + e}{5}$ $L = \frac{3(15.1) + 2(15.7) + 16.8 + 18.6}{5}$ $L = \frac{45.3 + 31.4 + 16.8 + 18.6}{5}$ $L = 15.0$		$H = \frac{3e + 2d + c + a}{5}$ $H = \frac{3(18.6) + 2(17.4) + 16.8 + 15.1}{5}$ $H = \frac{35.8 + 34.8 + 16.8 + 15.1}{5}$ $H = 18.5$	
RESPONSABLE: <u>Silvia Muñoz</u> FECHA: <u>2006-06-21</u>			
SIMBOLOGIA UTILIZADA:			
C = Diámetro Promedio (mm) de 26 lecturas de los halos obtenidos con la Solución Estándar de concentración media. a,b,d,e = Diámetro Promedio (mm) corregidos para las concentraciones más bajas y más altas del estándar respectivamente. L = Diámetro de Halos (mm) calculado para la concentración más baja de la gráfica de respuesta. H = Diámetro de Halos (mm) calculado para la concentración más alta de la gráfica de respuesta. i = Estándar a, b, c ó d respectivamente. X = Promedio de Halos de Inhibición (mm)			

Figura N° 12 Cálculos para determinar el punto mínimo y máximo de la línea dosis-respuesta

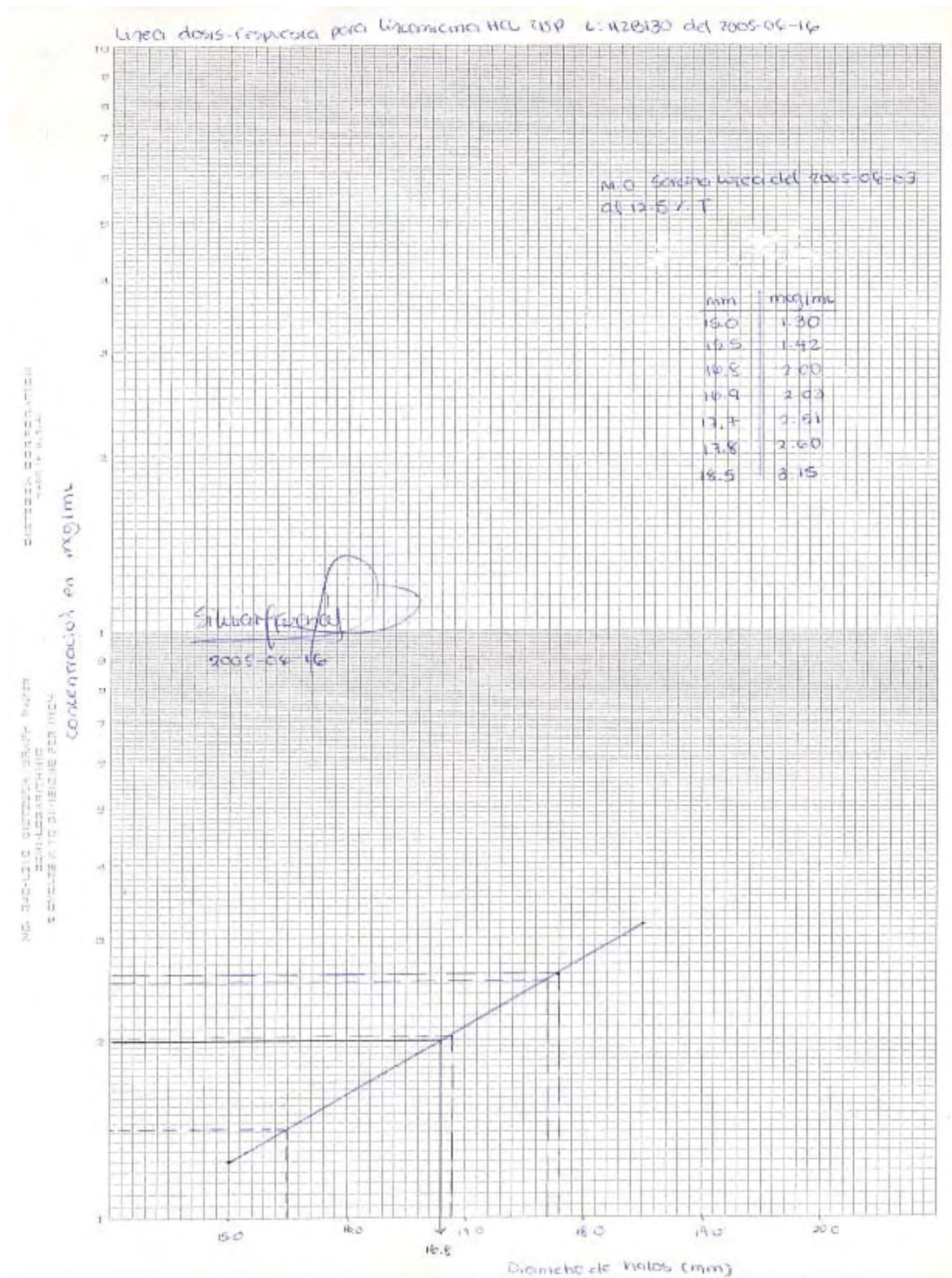


Figura N° 13 Línea dosis- respuesta

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología						DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS RESULTADOS Y CALCULOS DE MUESTRA.								
ENSAYO N° <u>98/2005</u>		FECHA ANALISIS: <u>2005-06-16</u>			FECHA LECTURA: <u>2005-06-17</u>									
		HORA INICIO DE INCUBACION: <u>15:00</u>			HORA FINAL DE INCUBACION: <u>09:00</u>									
NOMBRE DE LA MUESTRA: <u>Lincamicina HCl.</u>		DF: _____		LOTE: <u>04100000579</u>										
DILUCION DE LA MUESTRA: $\begin{array}{ccc} \equiv 50 \text{ mg} & \text{---} & 50 \text{ mL} \\ & \downarrow & \\ & 2 \text{ mL} & \text{---} & 200 \text{ mL} \\ & & \downarrow & \\ & & 2.5 \text{ mL} & \text{---} & 10 \text{ mL} \\ & & & & (2.5 \text{ mg/mL}) \end{array}$								FD = <u>20</u>						
MUESTRA	LECTURAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	DIFERENCIA (X ₁ - X ₂)
1	ESTANDAR	17.6	18.0	17.2	17.6	17.2	17.6	17.8	17.5	17.8	17.4	17.7	17.6	1.0
	MUESTRA	18.4	19.0	18.3	18.4	18.2	18.7	18.8	18.5	18.3	18.6			
2	ESTANDAR	17.6	17.2	17.6	17.8	17.5	17.8	17.6	18.0	18.0	17.7			1.0
	MUESTRA	18.4	18.2	18.4	18.8	18.5	18.8	18.4	19.0	19.0	18.7			
3	ESTANDAR	17.8	17.2	17.3	17.9	17.4	17.7	17.9	17.4	17.7	17.6			1.0
	MUESTRA	18.9	18.2	18.2	18.9	18.5	18.7	18.9	18.4	18.7	18.6			
DIAMETRO DE HALOS DE LA MUESTRA CORREGIDOS PARA INTERPOLAR EN LA LINEA DOSIS - RESPUESTA (X ₁ - X ₂)														
$16.8 + 1.0 = 17.8 \approx 2.6 \text{ mg/mL}$ $2.60 \times 20 = 52.0 \text{ mg}$					$16.8 + 1.0 = 17.8 \approx 2.6 \text{ mg/mL}$ $2.60 \times 20 = 52.0 \text{ mg}$					$16.8 + 1.0 = 17.8 \approx 2.6 \text{ mg/mL}$ $2.60 \times 20 = 52.0 \text{ mg}$				
CALCULO DE CONTENIDO:														
Peso de estándar: <u>62.2 mg</u>					Peso de estándar: <u>62.2 mg</u>					Peso de estándar: <u>62.2 mg</u>				
$\begin{array}{ccc} 52.0 \text{ mg} & \text{---} & 62.2 \text{ mg} \\ x & \text{---} & 100.0 \text{ mg} \end{array}$					$\begin{array}{ccc} 52.0 \text{ mg} & \text{---} & 62.2 \text{ mg} \\ x & \text{---} & 100.0 \text{ mg} \end{array}$					$\begin{array}{ccc} 52.0 \text{ mg} & \text{---} & 62.2 \text{ mg} \\ x & \text{---} & 100.0 \text{ mg} \end{array}$				
$X = 83.6\%$					$X = 83.6\%$					$X = 83.6\%$				
CALCULOS REALIZADOS EN BASE A LA LINEA DOSIS - RESPUESTA DE: <u>Lincamicina HCl USP de 2005-06-16</u>														
OBSERVACIONES: <u>concentración de principio activo del 125.0 %.</u>														
ANALISTA: <u>SINIA MUÑOZ.</u>					FECHA: <u>2005-06-21</u>					Vó Bo.: <u>[Signature]</u>				

Figura N° 14 Cálculo de potencia para la muestra

CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V. Control de Calidad Sección Microbiología		DETERMINACION DE POTENCIA DE ANTIBIOTICOS	
RESULTADOS			
ENSAYO N°: <u>98/2005</u>		OF. _____	
PRODUCTO M.P. <u>Amoxicilina HCl</u>		FECHA DE ANALISIS: <u>2005-06-21</u>	
LOTE/CONTROL: <u>0400000079</u>			
POTENCIA DE ANTIBIOTICOS METODO CILINDRO PLACA			
N° DE MUESTRA	%	MEDIA Y COEFICIENTE DE VARIACION OBTENIDOS	
1	83.6	$\bar{x} = 83.6\%$ $CV = 0.0\%$	
2	83.6		
3	83.6		
ESPECIFICACION OFICIAL: <u>NO menor del 79.0% (Usp)</u>			
OBSERVACIONES: <u>concentración del 175.0%) cumple especificación.</u>			
ANALISTA: <u>Elvia Carolina Muñoz</u>		Vc.Bo.: <u>BE</u> 2005-06-21	
FECHA DE EMISION: <u>2005-06-21</u>			

Figura N° 15 Cálculo del promedio y coeficiente de variación para la muestra