

9  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

V N A M

VALIDACION DEL METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETECCION  
DE TRAZAS DE PENICILINA COMO CONTAMINACION CRUZADA  
EN UNA PLANTA FARMACEUTICA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN  
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N

BEATRIZ CARBAJAL SALINAS

LILIANA CELINA CORONA LOEZA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

página

INDICE DE FORMULAS	i
INDICE DE ABREVIATURAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv

### I. PARTE TEORICA

I.1 INTRODUCCION	1
I.2 GENERALIDADES DE LA PENICILINA	3
I.2.1 PROPIEDADES DE LA PENICILINA	3
I.2.2 DEGRADACION DE LA PENICILINA	5
I.2.3 ALERGIAS A LA PENICILINA	7
I.2.4 TOXICIDAD DE LA PENICILINA	9
I.3 ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA CONTAMINACION CRUZADA CON ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS	12
I.3.1 NORMAS O REGULACIONES SEGUN FDA	12
I.3.2 NORMAS O REGULACIONES EN CANADA	13
I.3.3 NORMAS O REGULACIONES EN HOLANDA	13
I.3.4 NORMAS O REGULACIONES EN ESPAÑA	14
I.3.5 NORMAS O REGULACIONES EN MEXICO	14
I.4 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	16
I.4.1 DEFINICIONES	17
I.5 PRUEBAS NO PARAMETRICAS	19
I.5.1 GENERALIDADES	19
I.5.2 PRUEBA DE JONCKHEERE	20
I.5.2.1 FUNDAMENTO	20
I.5.2.2 CRITERIO DE ACEPTACION	23
I.5.2.3 ANALISIS DE RESULTADOS	23
I.5.3 PRUEBA DE SOMMERS	24
I.5.3.1 FUNDAMENTO	24
I.5.3.2 CRITERIO DE ACEPTACION	25
I.5.3.3 ANALISIS DE RESULTADOS	25

### II PARTE EXPERIMENTAL

II.1 OBJETIVOS	26
II.1.1 GENERALES	26
II.1.2 PARTICULARES	26
II.2 DESCRIPCION DE LA PLANTA FARMACEUTICA	27
II.3 METODO MICROBIOLOGICO DE DETECCION DE TRAZAS DE PENICILINA	31
II.3.1 DESCRIPCION DEL METODO DE DETECCION	31
II.3.1.1 REACTIVOS Y MATERIALES	31
II.3.1.2 PREPARACIONES	31
II.3.1.3 MUESTREO	31
II.3.1.4 INOCULACION EN LAS CAJAS PETRI	32
II.3.1.5 INCUBACION DE LAS CAJAS PETRI	32
II.3.1.6 LECTURA DE LAS CAJAS PETRI	32
II.3.2 IDENTIFICACION DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN LOS RESULTADOS	37

	página
II.3.3 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE OPERACION	37
II.3.3.1 ENSAYO PARA LA ELECCION DEL VEHICULO INERTE	37
II.3.4 VALIDACION	48
II.3.4.1 VALIDACION DEL SISTEMA	48
II.3.4.2 VALIDACION DEL METODO	50
II.3.4.3 ENSAYO PARA DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS DETERGENTES Y/O DESINFECTANTES SOBRE EL METODO DE DETECCION DE TRAZAS DE PENICILINA	52
<b>III RESULTADOS Y ANALISIS</b>	<b>54</b>
III.1 VALIDACION DEL SISTEMA	54
III.1.1 TABLAS DE CONTINGENCIA	54
III.1.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOMMERS	56
III.1.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE JONCKHEERE	57
III.1.4 ANALISIS	58
III.2 VALIDACION DEL METODO	60
III.2.1 TABLAS DE CONTINGENCIA	60
III.2.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOMMERS	62
III.2.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE JONCKHEERE	62
III.2.4 ANALISIS	63
III.3 INFLUENCIA DE LOS DETERGENTES Y DESINFECTANTES SOBRE LA DETECCION DE TRAZAS DE PENICILINA	65
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>V. VENTAJAS DEL ESTUDIO</b>	<b>71</b>
<b>VI. DESVENTAJAS DEL ESTUDIO</b>	<b>71</b>
ANEXO NO. 1 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	72
ANEXO NO. 2 PREPARACION DE SUSPENSIONES	73
ANEXO NO. 3 PREPARACION DE SOLUCIONES	74
ANEXO NO. 4 PREPARACION DE SOLUCIONES DE PENICILINA G POTASICA DE DIFERENTE CONCENTRACION PARA EVALUAR EL SISTEMA	75
ANEXO NO. 5 PREPARACION DE SOLUCIONES DE PENICILINA G POTASICA DE DIFERENTE CONCENTRACION PARA ELEGIR EL VEHICULO INERTE	76
ANEXO NO. 6 PREPARACION DE SOLUCIONES DE PENICILINA G POTASICA DE DIFERENTE CONCENTRACION PARA EVALUAR EL METODO	81

	página
ANEXO NO. 7 INCUBACION Y LECTURA DE LAS CAJAS PETRI	82
ANEXO NO. 8 LIMPIEZA Y DESINFECCION DE PLACAS DE ACERO INOXIDABLE	83
ANEXO NO. 9 TABLAS DE RESULTADOS PARA LA EVALUACION DEL SISTEMA	85
ANEXO NO. 10 TABLAS DE RESULTADOS PARA LA EVALUACION DEL METODO	94
ANEXO NO. 11 TABLAS DE RESULTADOS DE LA INFLUENCIA DE LOS DESINFECTANTES Y DETERGENTES	100
ANEXO NO. 12 CODIFICACION DE ANALISTAS	107
ANEXO NO. 13 FORMULACIONES DE LOS DETERGENTES Y DESINFECTANTES	108
ANEXO NO. 14 TABLAS DE CONTROL DE SIEMBRA DE CEPAS	109
ANEXO NO. 15 CONTROL DE AGUA DESTILADA UTILIZADA EN LA PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO Y SOLUCIONES	110
ANEXO NO. 16 TABLA DE DISTRIBUCION DE ZETA	111
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>112</b>

## INDICE DE FORMULAS

### 1.- ESTADIGRAFO DE CONTRASTE

Estadígrafo de Contraste:

$$Z_C = \frac{S}{\sqrt{S^2}}$$

$$S^2 = \frac{2(n^3 - \sum ti^3 - \sum ui^3) + 3(n^2 - \sum ti^2 - \sum ui^2) + 5n}{18} \\ + \frac{(\sum ti^3 - 3 \sum ti^2 + 2n)(\sum ui^3 - 3 \sum ui^2 + 2n)}{9n(n-1)(n-2)} \\ + \frac{(\sum ti^2 - n)(\sum ui^2 - n)}{2n(n-1)}$$

$$S = P - Q$$

$Z_C$  = zeta calculada (estadígrafo de contraste)

$Z_t$  = zeta de tablas

$S$  = establece la diferencia entre dos o más rangos

$S^2$  = varianza

$P$  = contribución positiva para el resultado de  $S$ . Es la suma del producto del número de observaciones de una celda en la tabla de contingencia, por la suma total de las observaciones de las celdas de la misma localizadas a su sureste, ignorando las celdas del mismo renglón y columna.

$Q$  = contribución negativa para el resultado de  $S$ . Es la suma del producto del número de observaciones de una celda en la tabla de contingencia por la suma total de las observaciones de las celdas de la misma, localizadas a su suroeste, ignorando las celdas del mismo renglón y columna.

- $n$  = número total de observaciones en la tabla de contingencia.  
 $u_i$  = sumatoria de los renglones de la tabla de contingencia  
 $t_i$  = sumatoria de las columnas de la tabla de contingencia

2.- DELTA DE SOMMERS

$$\delta = \frac{2 S}{n^2 - \sum t^2}$$

- $n$  = número total de observaciones en la tabla de contingencia  
 $t$  = total de la frecuencia asociada a la  $i$ -ésima concentración de penicilina  
 $\delta$  = delta de Sommers  
 $S$  =  $P - Q$   
 $P$  = referirse al estadígrafo de contraste  
 $Q$  = referirse al estadígrafo de contraste

## INDICE DE ABREVIATURAS

- nm = nanómetros
- °C = grados centígrados
- µg = microgramos
- g = gramos
- ml = mililitros
- hrs. = horas
- cm = centímetros
- Ho = hipótesis nula
- Ha = hipótesis alterna
- soln. = solución
- solns. = soluciones
- SL = caja petri con medio número uno para antibióticos inoculado con el microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341.
- SLP = caja petri con medio número uno para antibióticos inoculado con el microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341 más la enzima penicilinasas.
- CSL = caja petri control SL (caja petri con medio número uno para antibióticos inoculado con el microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341 sin inoculación de muestra).
- CSLP = caja petri control SLP (caja petri con medio número uno para antibióticos inoculado con el microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341 más la enzima penicilinasas, sin inoculación de muestra).
- TSL = caja testigo SL (caja petri con medio número uno para antibióticos inoculado con el microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341 con inoculación del vehículo inerte).

- TSLP = caja testigo SL (caja petri con medio -  
número uno para antibióticos inoculado  
con el microorganismo Sarcina lutea  
de la cepa ATCC 9341 más la enzima pe-  
nicilinasas con inoculación del vehículo  
inerte)
- FDA = Federal Drugs Administration
- CFR = Code Federal Regulation
- PREP. = preparación
- TRANS. = transferencia
- ESTADIST = estadístico
- PCLT = solución de peptona de caseína lecitina  
tween (polisorbato) 20.
- S. lutea = microorganismo Sarcina lutea de la  
cepa ATCC 9341

## INDICE DE FIGURAS

		página
Figura 1.	Estructura de la penicilina	4
Figura 2.	Perfil de pH para la hidrólisis de la penicilina	6
Figura 3.	Localización de las áreas de producción (planta baja)	29
Figura 4.	Localización de las áreas de producción (primer piso)	30
Figura 5.	Grado de inhibición en las cajas petri	34
Figura 6.	Diagrama de flujo: elección del vehículo inerte	38
Figura 7.	Diagrama de flujo: validación del sistema	49
Figura 8.	Diagrama de flujo: validación del método	51
Figura 9.	Diagrama de flujo: influencia de los detergentes y desinfectantes sobre el método de detección de trazas de penicilina.	53

## INDICE DE TABLAS

			página
Tabla	1.	Datos en la forma de una tabla de contingencia ordenada.	21
Tabla	2.	Resultados del vehículo inerte PCLT (1500 a 0.42 $\mu\text{g}$ )	40
Tabla	3.	Resultados del vehículo inerte PCLT (0.3 a 0.06 $\mu\text{g}$ )	41
Tabla	4.	Tabla de contingencia para el vehículo inerte PCLT.	42
Tabla	5.	Resultados del vehículo inerte cloroformo (150 a 0.3 $\mu\text{g}$ )	44
Tabla	6.	Resultados del vehículo inerte cloroformo (0.3 a 0.03 $\mu\text{g}$ )	45
Tabla	7.	Tabla de contingencia para el vehículo inerte cloroformo.	46
Tabla	8.	Tabla de contingencia para la evaluación del sistema en el primer día, primer analista.	54
Tabla	9.	Tabla de contingencia para la evaluación del sistema en el primer día, segundo analista.	55
Tabla	10.	Tabla de contingencia para la evaluación del sistema en el segundo día, primer analista.	55
Tabla	11.	Tabla de contingencia para la evaluación del sistema en el segundo día, segundo analista.	56
Tabla	12.	Resultados de delta de Sommers para cada una de las tablas de contingencia del sistema.	56
Tabla	13.	Valores de $u_i$ y $t_i$ de las tablas de contingencia del sistema.	57
Tabla	14.	Valores de $n^n$ , $Eu^2$ , $Eu^3$ , $\Sigma t^2$ y $\Sigma t^3$ de las tablas de contingencia del sistema.	57

		página
Tabla 15.	Resultados de la prueba de Jonckheere de cada tabla de contingencia para el sistema.	57
Tabla 16.	Tabla de contingencia para la evaluación del método en el - primer día, primer analista.	60
Tabla 17.	Tabla de contingencia para la evaluación del método en el - primer día, segundo analista.	61
Tabla 18.	Tabla de contingencia para la evaluación del método en el - segundo día, primer analista.	61
Tabla 19.	Resultados de delta de Sommers para cada una de las tablas de contingencia del método.	62
Tabla 20.	Valores de $u_i$ y $t_i$ de las tablas de contingencia del método.	62
Tabla 21.	Valores de $n^n$ , $\Sigma u^2$ , $\Sigma u^3$ , $\Sigma t^2$ y $\Sigma t^3$ de las tablas de contingencia del método.	62
Tabla 22.	Resultados de la prueba de Jonckheere de cada tabla de contingencia para el método.	63
Tabla 23.	Resultados de la moda y amplitud del grado de inhibición, - obtenido en las seis cajas para los diferentes sanitizantes y detergentes.	66
Tabla 24.	Influencia de los sanitizantes y detergentes sobre el método de detección de trazas de penicilina.	67
Tabla 25.	Diferentes casos que se presentan en los resultados obtenidos de las lecturas de las cajas - petri y su interpretación.	68
Tabla 26.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, primer analista (cantidad de - penicilina: 0.015 $\mu$ g).	85

		página
Tabla 27.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.015 $\mu\text{g}$ ).	86
Tabla 28.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.015 $\mu\text{g}$ ).	86
Tabla 29.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.015 $\mu\text{g}$ ).	87
Tabla 30.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.03 $\mu\text{g}$ ).	87
Tabla 31.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.03 $\mu\text{g}$ ).	88
Tabla 32.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.03 $\mu\text{g}$ ).	88
Tabla 33.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.03 $\mu\text{g}$ ).	89
Tabla 34.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.045 $\mu\text{g}$ ).	89
Tabla 35.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.045 $\mu\text{g}$ ).	90
Tabla 36.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.045 $\mu\text{g}$ ).	90
Tabla 37.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.045 $\mu\text{g}$ ).	91

		página
Tabla 38.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.06 µg).	91
Tabla 39.	Resultados de la evaluación del sistema en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.06 µg).	92
Tabla 40.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.06 µg).	92
Tabla 41.	Resultados de la evaluación del sistema en el segundo día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.06 µg).	93
Tabla 42.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.15 µg).	94
Tabla 43.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.15 µg).	94
Tabla 44.	Resultados de la evaluación del método en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.15 µg).	95
Tabla 45.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.3 µg).	95
Tabla 46.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.3 µg).	96
Tabla 47.	Resultados de la evaluación del método en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.3 µg).	96
Tabla 48.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.45 µg).	97

		página
Tabla 49.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.45 $\mu$ g).	97
Tabla 50.	Resultados de la evaluación del método en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.45 $\mu$ g).	98
Tabla 51.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.6 $\mu$ g).	98
Tabla 52.	Resultados de la evaluación del método en el primer día, segundo analista (cantidad de penicilina: 0.6 $\mu$ g).	99
Tabla 53.	Resultados de la evaluación del método en el segundo día, primer analista (cantidad de penicilina: 0.6 $\mu$ g).	99
Tabla 54.	Resultados con el sanitizante hipoclorito de sodio.	100
Tabla 55.	Resultados con el sanitizante germigen.	101
Tabla 56.	Resultados con el sanitizante benzal.	102
Tabla 57.	Resultados con el sanitizante sanizol al 80%	103
Tabla 58.	Resultados con el sanitizante sanitizer.	104
Tabla 59.	Resultados con el sanitizante sanizol al 50%	105
Tabla 60.	Resultados con el sanitizante LPH.	106

I.1 INTRODUCCION

El problema que existe de encontrar productos farmacéuticos contaminados con residuos de otros productos farmacéuticos diferentes, es lo que se denomina comunmente contaminación cruzada; dicho fenómeno ha adquirido recientemente una importancia relevante debido al riesgo potencial que representa para la salud (21, 7). Uno de los casos más importantes es la contaminación cruzada de antibióticos no penicilínicos con trazas de penicilina, debido a la hipersensibilidad o sensibilización alérgica que provoca (7, 12, 13, 15, 29).

Esta hipersensibilidad se presenta sobre todo en pacientes alérgicos y generalmente en personas que han recibido un tratamiento previo (29). Algunos sujetos presentan reacciones inmediatas a la penicilina con el primer tratamiento, lo que se deriva de un contacto oculto, tal como la administración de medicamentos contaminados con penicilina (7, 12, 13, 15).

Debido a la existencia de este grave problema la FDA a través de un comité especial para los aspectos relacionados con la contaminación penicilínica, ha emitido Buenas Prácticas de Manufactura Farmacéutica, considerando las condiciones para prevenir este tipo de contaminación cruzada (21, 7).

En base a lo anterior, en México, surge la necesidad de reglamentar los procesos de fabricación, dosificación y empaque o acondicionamiento de productos farmacéuticos no penicilínicos.

En el laboratorio farmacéutico donde se realizó el presente

estudio, se elaboran los dos tipos de antibióticos que estamos considerando, por lo cual es necesario mantener el control adecuado del grado de contaminación cruzada, tanto en las áreas de producción, como en los productos (amikacinas y kanamicinas inyectables).

El presente estudio viene a resolver la necesidad de contar con un método validado que nos permita tener un control ambiental confiable y eficiente del grado de contaminación en las áreas no penicilínicas de la planta.

El método a validar es un método de detección de trazas de penicilina que se emplea para todas las superficies (maquinaria, pisos, paredes y mesas de trabajo) de las áreas de fabricación; está basado en el método de determinación de penicilina en productos no penicilínicos establecido en el CFR título 21, 141 inciso 104, y se fundamenta en la sensibilidad del microorganismo Sarcina lutea de la cepa ATCC 9341 a la penicilina G potásica, lo cual es observado por la inhibición del crecimiento del microorganismo en cajas de agar previamente inoculadas (1, 3, 4, 7, 8, 13, 30, 31).

Como propósito de estudio, se determinó la confiabilidad del método para detectar contaminación penicilínica, a través de pruebas estadísticas no paramétricas, tales como la prueba de Jonckheere y la de Sommers (22).

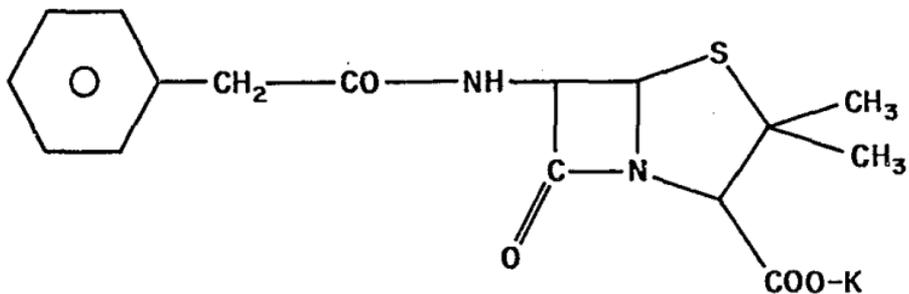
## I.2 GENERALIDADES DE LA PENICILINA

### **I.2.1 PROPIEDADES DE LA PENICILINA**

La penicilina es el nombre aplicado a un grupo de sustancias antibióticas producidas por varias especies de hongos pertenecientes al género penicillium, especialmente Penicillium notatum y Penicillium chrysogenum. Son cristales, moderadamente higroscópicos, fácilmente solubles en agua, en solución isotónica de cloruro de sodio y soluciones de dextrosa. Moderadamente soluble en alcohol, en glicerol y muchos otros alcoholes. El pH de una solución acuosa al 3% es de 5.0 a 7.5. Soluciones almacenadas en refrigeración se mantienen estables por varios días (25).

La penicilina se inactiva rápidamente por ácidos, álcalis y por agentes oxidantes. Un mg de penicilina G potásica equivale a 1595 unidades. Una unidad internacional (UI) ó unidad USP de penicilina equivale a 0.6  $\mu$ g de penicilina G sódica (25).

Las distintas sustancias de la familia de la penicilina poseen todas un núcleo químico común, el ácido penicilánico que tiene un sistema anular formado por la unión de un anillo  $\beta$ -lactámico tetragonal y uno pentagonal de tiazolidina, el primero constituye una estructura única de estos antibióticos por lo que se denominan  $\beta$ -lactámicos. El citado núcleo está unido por un enlace peptídico a una cadena lateral o radial. Los distintos tipos de penicilina resultan de la presencia de diferentes cadenas laterales y por otra parte, siendo la penicilina un ácido carboxílico puede formar sales con metales y bases orgánicas (24).



ESTRUCTURA DE LA PENICILINA  
G POTASICA

FIGURA 1

### I.2.2 DEGRADACION DE LA PENICILINA

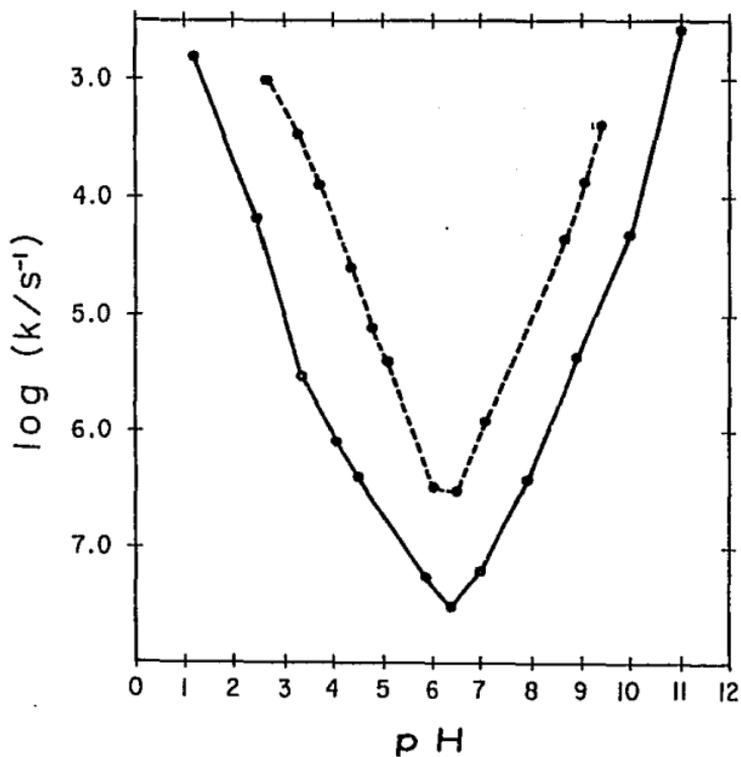
La penicilina se inactiva por hidrólisis, pero los productos de degradación varían según las condiciones de reacción:

a) Hidrólisis en medio ácido -jugo gástrico, por ejemplo, o bien por acción de la enzima penicilinasas o  $\beta$ -lactamasa, producida por bacterias tales como la Escherichia coli o colibacilo, el Proteus mirabilis, Pseudomona aeruginosa y sobre todo por ciertas cepas de Staphylococcus aureus o estafilococos resistentes a la penicilina; se produce la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico y la formación de ácidos peniciloicos, farmacológicamente inactivos que a su vez por descarboxilación dan origen a los ácidos peniloicos igualmente inactivos (24).

b) La hidrólisis también puede realizarse por otra enzima, la acilasa o penicilinamidasas, producida por bacterias como la Escherichia coli, lo que da lugar al ácido 6-aminopenicilánico, de muy poca actividad, pero que sirve de sustancia inicial para la producción de las penicilinas semisintéticas.

La penicilina G potásica se degrada por hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico en soluciones acuosas.

El perfil de pH de máxima estabilidad es de 6.75 y el intervalo de pH de mayor estabilidad es muy estrecho como se observa en la figura no. 2 (6)



----- Efectos del Buffer a 60° C  
 ————— Soln. de NaCl 0.5 M a 30° C (10)

Perfil de pH para la hidrólisis de la penicilina.

FIGURA 2

El perfil de pH fué determinado por Brodersen (6) a 30°C y más recientemente por Finholt, Jurgensen y col. (6) a 60°C. El trabajo más reciente de Brodersen no considera en la reacción el agua como importante y fue hecho en NaCl al 0.5 M. El trabajo más reciente de Finholt, Jungersen y col. corrige el perfil por los efectos del buffer. La figura no. 2 presenta los resultados de ambos estudios. Las constantes de velocidad de degradación por Finholt y col., a 60°C son las siguientes: (6)

$$k_2 = 4.921 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_3 = 1.67 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 1.77 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

El cálculo de vida media a pH 6.75 y 30°C es de  $3.3 \times 10^6$  seg o 38 días. La vida de anaquel ( $t_{90}$ ) es de 6 días.

La más importante fuente de inestabilidad de la penicilina es la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico. En solución, se forman varios productos dependiendo de las condiciones de reacción, esto incluye ácido bencilpeniloico, ácido bencilpeniciloico y ácido penicilánico (17)

Si el proceso se lleva a cabo durante un tiempo suficiente, los productos finales de degradación son el aldehído bencilpenicilo, dióxido de carbono y penicilamina (17).

### 1.2.3 ALERGIAS A LA PENICILINA

Con el nombre de alergia a los fármacos, hipersensibilidad o sensibilización, se designa una respuesta extraordinaria, anormal, completamente diferente de la acción farmacológica característica de aquellas, y que tiene como

mecanismo una reacción inmunológica, generalmente de antígeno-anticuerpo (24). Los rasgos esenciales de la alergia medicamentosa son:

1) La reacción alérgica no aparece después de la administración inicial del fármaco, sino al cabo de un período de incubación de 1 a 2 semanas, después de los cuales su suministro provoca los trastornos característicos, aún con dosis muy pequeñas, que pueden producir síntomas graves (24).

2) Estas respuestas son comunes a muchos fármacos y semejantes a las manifestaciones que producen las enfermedades alérgicas a saber, rinitis, asma, urticaria y otras erupciones cutáneas (24).

3) Estos síntomas se reproducen con cada administración del fármaco y no se producen cuando se suprime la administración del mismo, y la sensibilización puede durar meses o años (24).

4) Las reacciones son específicas en un individuo determinado, es decir, restringidas a un fármaco o a un pequeño número de fármacos emparentados químicamente (24).

El mecanismo de la alergia a los fármacos es semejante al de los fenómenos alérgicos en general, como es sabido, en las enfermedades alérgicas el individuo es sensibilizado por la introducción de un antígeno o alérgeno, por lo general una proteína que origina la formación de anticuerpos del tipo IgE o reagininas que son fijados por las células del individuo (anticuerpos citotrópicos) especialmente mastocitos y basófilos. Una nueva introducción del antígeno lleva a una reacción entre el mismo y el anticuerpo a nivel de los tejidos, con liberación de

sustancias de los gránulos de los basófilos y mastocitos, especialmente histamina, pero también serotonina, bradiquinina y la sustancia de reacción lenta que provocan los fenómenos alérgicos (24).

Se acepta pues que los fármacos que provocan hipersensibilidad o alergia, actuando como haptenos, se combinan con las proteínas tisulares por enlaces covalentes, originando antígenos que provocan la formación de anticuerpos que se fijan en los tejidos, la introducción sucesiva del fármaco origina nuevamente el antígeno que se combina con el anticuerpo liberándose las sustancias arriba mencionadas, que son las responsables de las reacciones alérgicas (24).

#### **1.2.4 TOXICIDAD DE LA PENICILINA**

Reacciones de Hipersensibilidad. La penicilina es uno de los antibióticos menos tóxicos, pero comunmente causa reacciones de hipersensibilidad. La hipersensibilidad o sensibilización es el resultado de un tratamiento previo; pero algunos sujetos presentan reacciones inmediatas a la penicilina, con el primer tratamiento. En este caso se postula como un "contacto oculto" tal como el consumo de leche que contenía penicilina como resultado de un tratamiento veterinario (15).

El fenómeno de alergia fue más común con las primeras preparaciones amorfas de penicilina por los contenidos de impurezas, incluyendo proteínas de elevado peso molecular; pero la molécula de penicilina por sí misma también puede provocar alergia por su acción como hapteno que combinado con proteínas

forma un compuesto antigénico. En adición, varios derivados del núcleo de la penicilina; por ejemplo el ácido 6-aminopenicilánico frecuentemente provocan sensibilidad cruzada demostrando que el núcleo por sí mismo juega un papel importante. Se predice que todas las penicilinas derivadas del ácido 6-aminopenicilánico pueden causar reacción cruzada en individuos sensibilizados (24).

Aunque la prevalescencia de las reacciones alérgicas a las penicilinas es desconocida, se estima un rango de 1 a 10% de todos los pacientes tratados. La mayoría de tales reacciones adversas son dermatológicas (14).

La administración de penicilina en pacientes hipersensibles es una de las causas más comunes de anafilaxis con una frecuencia reportada de 1 a 5 reacciones por 10,000 pacientes tratados. Según el National Institute of Allergy (1979) la inducción de anafilaxis por penicilina causa de 400 a 800 muertes al año en USA. Cerca del 75% de los pacientes que mueren por anafilaxis seguida por la administración de penicilina, no tenían historia de reacciones alérgicas a la misma (14).

En medicina, la alergia a los fármacos es un buen ejemplo de los efectos secundarios en el uso terapéutico de los antibióticos, especialmente los  $\beta$ -lactámicos. Tal hecho puede presentarse debido a la presencia de residuos antibióticos por ejemplo en alimentos que pueden ser responsables de reacciones de hipersensibilidad en un pequeño número de individuos. En relación al riesgo de sensibilización primaria, es improbable que los residuos sean la causa de toda la respuesta inmune en vista de los bajos niveles que se encuentran, en comparación con los elevados niveles del medicamento recibidos durante un uso

terapéutico. No se ha encontrado evidencia documentada de que algún individuo pueda llegar a ser sensibilizado por residuos de penicilinas. Además de que la vía oral es mucho menos sensibilizante que las parenterales, como se mencionó anteriormente. El riesgo de las reacciones alérgicas en individuos presensibilizados puede ser estimado similarmente y otra vez se concluye que con factores tales como: dosis, administración oral, y baja concentración del fármaco, es improbable que un derivado significativamente antigénico pueda ser formado. Sin embargo una revisión de la literatura sobre hipersensibilidad a la penicilina reveló un pequeño número de individuos previamente sensibilizados de los cuales hay razones clínicas y evidencias documentadas de que residuos de penicilina en leche provocaron una reacción alérgica usualmente un salpullido. Aunque estos casos son muy raros (menos de 10 casos reportados en los últimos 25 años) ilustran la continua necesidad del control de antibióticos y vigilancia de residuos. La alergia en el hombre está determinada por genética y otros factores, no existen métodos validados, que determinen el grado de efecto. Los inmunógenos más potentes son los externos al huésped y son grandes moléculas (proteínas u otras macromoléculas); pero los fármacos aunque son moléculas extrañas, sus pesos moleculares son usualmente pequeños para ser inmunogénicos, por lo cual para que los fármacos puedan actuar como haptenos (pro-alérgenos) los cuales deben llegar a combinarse con proteínas acarreadoras para ser inmunogénicos y provocar la formación de anticuerpos. Esta combinación de proteína acarreadora-fármaco se puede localizar en

tejidos o fluidos biológicos. Consecuentemente la naturaleza de la reacción inmune depende de un número de factores específicos tales como la naturaleza del antígeno, la vía de administración y la dosis. Con respecto a la naturaleza del antígeno las proteínas acarreadoras heterólogas son más inmunogénicas que las autólogas. La densidad del fármaco como epítipo determina la potencia de la conjugación; la dosis también es muy importante, ya que dosis bajas pueden provocar reacciones en individuos sensibilizados, mientras que dosis altas pueden ser necesarias para la sensibilización (13).

En algunas instancias las reacciones de tipo alérgico pueden ocurrir con la primera exposición al fármaco pero los mecanismos inmunológicos pueden no estar involucrados. Así los mismos mediadores pueden ser liberados a través de mecanismos farmacológicos y provocar condiciones clínicas similares. Estas reacciones son llamadas pseudoalergias o reacciones pseudoanafilácticas.

### I.3 ASPECTOS REGULATORIOS SOBRE LA CONTAMINACION CRUZADA CON ANTIBIOTICOS B-LACTAMICOS

#### I.3.1 NORMAS O REGULACIONES SEGUN FDA

A partir de la realización de una comisión consultiva sobre contaminación penicilínica convocada por la FDA en 1965; se establecieron como límites permisibles: 0.5 UI (0.3 µg) de penicilina para fármacos orales y 0.05 UI (0.03 µg) para fármacos parenterales por unidad de dosis. Nuevos reglamentos reducen el límite a cero (15).

En relación a las Buenas Prácticas de Manufactura Farmacéutica, la FDA en 1978 establece lo siguiente:

Subparte C, Sección 211.42, inciso d): Las operaciones relacionadas con la fabricación, elaboración y empaque de penicilina, se realizarán en instalaciones separadas de aquellas usadas para otros productos farmacéuticos para el consumo humano.

Subparte I, Sección 211.176 si existe una posibilidad razonable de que un producto farmacéutico que no contenga penicilina haya estado expuesto a contaminación con penicilina, este producto debe ser sometido a prueba para determinar la presencia de penicilina. Si se encuentran niveles detectables, tal producto no se pondrá en el mercado (10).

#### **I.3.2 NORMAS O REGULACIONES EN CANADA**

Otro país que hace incapié en lo que a instalaciones se refiere es Canada que señala en las Buenas Prácticas de Fabricación, emitidas en 1982 por la Dirección General de Protección de la Salud, del Ministerio de Salud y Bienestar Social de Canada, que:

1).- Las instalaciones donde se produce un lote total o parcial de un medicamento, deben ser diseñadas, construidas y mantenidas en forma que:

c) eviten la contaminación del producto y la adición de sustancias extrañas al medicamento (10).

#### **I.3.3 NORMAS O REGULACIONES EN HOLANDA**

En Holanda la Buenas Prácticas de Manufactura en 1984 señalan:

capítulo no. 7, inciso 7.4 Durante las tareas con materias primas secas, deberá presentarse atención especial a la proliferación y diseminación del polvo. Esto involucra particularmente la producción con materias primas que causan hipersensibilidad o que son activas en muy pequeñas dosis. En este mismo inciso se considera que la ropa de protección para las tareas que se llevan a cabo con productos que contienen materias primas con riesgo especial de contaminación cruzada, deben ser tratadas de acuerdo a procedimientos específicos.

Por otro lado también se considera que cuando proceda deberán realizarse controles periódicos para detectar una contaminación cruzada de acuerdo a procedimientos específicos (10).

#### **I.3.4 NORMAS O REGULACIONES EN ESPAÑA**

Las normas correctas de fabricación y control de calidad de los medicamentos, emitidas por el Ministerio de Sanidad y Consumo en España en 1985, establecen en el capítulo no. 4, inciso 4.1.1, lo siguiente: Merecen especial atención y tratamiento los locales destinados a fabricar medicamentos estériles, ciertos antibióticos, hormonas y citostáticos. Es absolutamente necesario disponer de áreas separadas específicamente diseñadas para estos fines, así como de una documentación especial que indique tanto el tiempo como la forma de limpieza y esterilización (10).

#### **I.3.5 NORMAS O REGULACIONES EN MEXICO**

En México, la Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica, la edición no. 3 de 1989, avaladas por la Comisión

Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, establece en el capítulo V, inciso no. 1.2, inciso h) El manejo, procesamiento y empaque de productos, tales como  $\beta$ -lactámicos, hormonales, veterinarios y todos aquellos que marque la Regulación Sanitaria vigente, deberán estar separados completamente de las áreas empleadas para otro tipo de productos.

En el capítulo VIII, inciso 5.2.3 En la fabricación de los productos  $\beta$ -lactámicos, hormonales, veterinarios y todos los que marque la regulación sanitaria vigente, además de cumplir con los requisitos mencionados en el capítulo V inciso 1.2, h) el personal que realice dichos procesos, no deberá tener acceso a las demás áreas de producción, portando la indumentaria que emplee en aquellas.

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, en el capítulo II, artículo 32, establece: Está prohibida la venta o suministro de los productos o materias primas que sean adulterados, contaminados o alterados durante cualquiera de las fases del proceso. La infracción de ésta disposición originará la adopción de medidas de seguridad por parte de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, además de las sanciones administrativas que procedan.

Artículo 33. Se considera adulterado un producto cuando:

I Su naturaleza o composición no corresponda a aquellas con que se etiquete, anuncie, expendo, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización.

Artículo 34. Se considera contaminado el producto o materia prima que contenga microorganismos, hormonas, bacteriostáticos, plaguicidas, radioisótopos, así como cualquier materia o sustancia no autorizada o en cantidades que rebasan los límites máximos permitidos que establezca la Secretaría u otra autoridad competente.

Artículo 35. Se considera alterado un producto o materia prima cuando, por efecto de cualquier causa haya sido objeto de modificaciones en su composición intrínseca que:

II Lo conviertan en nócivo para la salud.

De acuerdo a lo establecido a la Ley General de Salud, y en el reglamento correspondiente, no debe haber medicamentos en el mercado, que se encuentren contaminados, adulterados o alterados.

#### **I.4 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

Debido al acelerado desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, surge como una necesidad de la industria farmacéutica, la validación de métodos de análisis (2).

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método (2).

La validación de un método analítico se define como el

proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio y pruebas estadísticas que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (2).

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico, prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación (2).

#### **I.4.1 DEFINICIONES**

**LINEALIDAD.** La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado (2).

**INTERVALO DE CONFIANZA.** El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal (2).

**EXACTITUD.** La exactitud de un método analítico es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia (2).

**PRECISION.** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando

el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación (2).

a) REPETIBILIDAD Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.) (2)

b) REPRODUCIBILIDAD Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferente analista, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.) (2).

LIMITE DE DETECCION. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas (2).

ESPECIFICIDAD. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra (2).

## I.5 PRUEBAS NO PARAMETRICAS

### I.5.1 GENERALIDADES

Aquellos procedimientos que prueban hipótesis que no son afirmaciones acerca de parámetros de población se clasifican como no paramétricos, mientras que aquellos que hacen alguna suposición acerca de la población muestreada se conocen como procedimientos a distribución libre . A pesar de esta diferencia, se utilizan los términos no paramétrico y a distribución libre indistintamente y se analizan los diversos procedimientos de ambos tipos bajo el título de estadísticas no paramétricas.

La estadística no paramétrica presenta las siguientes ventajas:

1.- Permite las pruebas de hipótesis que no constituyen afirmaciones a cerca de valores de los parámetros poblacionales.

2.- Se utiliza debido a que se desconoce la distribución de la población muestreada, y

3.- Los datos analizados constan solamente de categorías o clasificaciones. Como es el caso de las lecturas del grado de inhibición, que no están basadas en una escala lo suficientemente sólida como para permitir las operaciones aritméticas necesarias para llevar a cabo los procedimientos paramétricos.

Es importante considerar que la escala de medición para este método es de tipo ordinal, es decir las lecturas realizadas no sólo difieren de una categoría a otra, sino que también pueden clasificarse por rango (11).

Como desventajas de la estadística no paramétrica, podemos considerar las siguientes:

1.- El uso de procedimientos no paramétricos con datos que pueden manejarse con un procedimiento paramétrico conduce a un desperdicio de información y

2.- La aplicación de algunas de las pruebas no paramétricas puede ser laboriosa para muestras grandes.

## **I.5.2 PRUEBA DE JONCKHEERE**

### **I.5.2.1 FUNDAMENTO**

La prueba de Jonckheere proporciona una manera alternativa de generalizar la prueba de suma de rangos con más de dos muestras. En esta prueba se supone que la variable explicativa es ordinal, de modo que en ella se prueba una predicción ordenada acerca de las muestras que se están comparando. Para que la prueba sea válida, la ordenación predicha de las muestras deberá hacerse independientemente de los datos. La prueba de Jonckheere emplea la estadística de la prueba de  $S$ . El cálculo de  $S$  se efectúa a partir de los datos representados en la forma de una tabla de contingencia ordenada (ver tabla no. 1); en los renglones se indican todos los niveles de la variable explicativa (cualquier cantidad medible que puede variar y que explica la variación de la variable de respuesta), escritos en el orden predicho, mientras que en las columnas se indican todos los niveles de la variable de respuesta en orden. En las casillas de la tabla se indica el número de observaciones que se obtienen como resultado de cada una de las posibles combinaciones de los resultados (22).

Tabla no. 1

Datos en la forma de una tabla de contingencia ordenada.

v. explicativa \ v. de respuesta	6	7	8	9	ti
4	1	3	3	3	10
5	1	2	4	3	10
6	0	0	3	7	10
ui	2	5	10	13	n = 30

$S$  se obtiene con la siguiente expresión:  $S = P - Q$

Para obtener  $P$  se suman todos los resultados  $p$  y para obtener  $Q$  se suman todos los resultados  $q$ ; donde  $p$  y  $q$  son las contribuciones positiva y negativa respectivamente, de ese resultado a  $S$ .

En las tablas de contingencia, para cada casilla diferente de cero,  $p$  se obtiene multiplicando el número de observaciones de la casilla por la suma total del número de observaciones de las demás casillas localizadas a su sureste y  $q$  se obtiene multiplicando el número de observaciones de la casilla por la suma total del número de observaciones de las demás casillas localizadas a su suroeste. El último renglón no se toma en cuenta puesto que no hay nada abajo.

Cuando existen empates en la variable de respuesta la separación entre los valores consecutivos posibles de  $S$  se vuelve irregular, de modo que no hay ninguna corrección por continuidad que pueda aplicarse generalmente. La fórmula que se necesita para la varianza de  $S$  cuando hay empates es la siguiente:

$$\begin{aligned}
 s^2 &= \frac{2(n^3 - \sum t_i^3 - \sum u_i^3) + 3(n^2 - \sum t_i^2 - \sum u_i^2) + 5n}{18} \\
 &+ \frac{(\sum t_i^3 - 3 \sum t_i^2 + 2n)(\sum u_i^3 - 3 \sum u_i^2 + 2n)}{9n(n-1)(n-2)} \\
 &+ \frac{(\sum t_i^2 - n)(\sum u_i^2 - n)}{2n(n-1)}
 \end{aligned}$$

Donde  $t_i$  se refiere a la sumatoria de los renglones de la tabla de contingencia y  $u_i$  se refiere a la sumatoria de las columnas.

El cálculo de  $Z_c$  entonces está dado por:

Estadígrafo de contraste:

$$Z_c = \frac{S}{\sqrt{s^2}}$$

### I.5.2.2 CRITERIO DE ACEPTACION

Se empleará la siguiente regla de decisión para determinar la linealidad del sistema y el método utilizando la prueba de Jonckheere:

Si	$Z_c < Z_t$	No se rechaza $H_0$
Si	$Z_c \geq Z_t$	Se rechaza $H_0$

### I.5.2.3 ANALISIS DE RESULTADOS

Tomando en cuenta que la variable predictora (cantidad de penicilina) es una variable cuantitativa, la cual se mide en una escala aritmética; y la variable de respuesta (grado de inhibición del crecimiento del indicador biológico) es una variable cualitativa ordinal, la cual se mide en una escala ordinal; es necesario establecer si existe una asociación directamente proporcional entre ambas variables, por lo que se aplicará la prueba de Jonckheere a los resultados obtenidos para el sistema y el método, empleando la siguiente prueba de hipótesis:

$H_0$ : No existe asociación directamente proporcional entre la cantidad de penicilina con el grado de inhibición del crecimiento del indicador biológico en la caja petri.

Ha: Existe asociación directamente proporcional entre la cantidad de penicilina con el grado de inhibición del crecimiento del indicador biológico en la caja petri.

### I.5.3 PRUEBA DE SOMMERS

#### I.5.3.1 FUNDAMENTO

La delta ( $\delta$ ) de Sommers es una medida de asociación útil para datos que pueden representarse como una tabla de contingencia ordenada, para los cuales  $S$  es el parámetro estadístico para esta prueba. Esta medida de asociación resume un grupo de datos usando un solo número. La finalidad de un estudio experimental es demostrar que la variación de la variable explicativa produce variación en la variable de respuesta. La delta de Sommers es una medida asimétrica ya que se enfoca en forma particular en la variable explicativa. Con esta prueba se puede predecir el resultado de la variable de respuesta a partir del conocimiento de la variable explicativa.

La delta de Sommers ( $\delta$ ) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\delta = \frac{2 S}{n^2 - \sum t^2}$$

donde  $S$ ,  $n$  y  $t$  fueron descritas previamente.

### I.5.3.2 CRITERIO DE ACEPTACION

No existe un criterio de aceptación para este tipo de variables, esta prueba sólo indica el grado de asociación que existe entre las mismas.

### I.5.3.3. ANALISIS DE RESULTADOS

La prueba de Sommers se aplica a los resultados representados en una tabla de contingencia ordenada, obtenidos de la experimentación.

## II.1 O B J E T I V O S

### **GENERALES**

a).- Determinar la confiabilidad de un método microbiológico en placa para la detección de trazas de penicilina en superficies (pisos, paredes y maquinaria) por medio de pruebas estadísticas no paramétricas.

b).- Observar la influencia de los detergentes y desinfectantes empleados en la limpieza y desinfección de las superficies de las áreas de fabricación no penicilínicas sobre el método de detección de trazas de penicilina.

### **PARTICULARES**

1).- Medir con la prueba de Sommers (22) la asociación entre las variables: grado de inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba Sarcina lutea (variable de respuesta) y la cantidad de penicilina (variable explicativa), para el sistema y el método.

2).-Evaluar con la prueba estadística no paramétrica de Jonckheere (22) la linealidad, precisión y reproducibilidad del sistema y el método.

3).- Determinar la cantidad mínima de penicilina donde hay inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba Sarcina lutea (límite de detección) para el sistema y el método.

## II.2 DESCRIPCION DE LA PLANTA FARMACEUTICA

En el laboratorio farmacéutico en donde se llevó a cabo el presente estudio se elaboran antibióticos penicilínicos (polvos orales y polvos inyectables) y antibióticos no penicilínicos (líquidos inyectables) dichos productos se fabrican en la misma planta.

En esta planta las áreas penicilínicas y no penicilínicas se encuentran contiguas en la planta como se observa en la figura no. 1, tales áreas son:

- I.- Area aséptica de llenado de polvos penicilínicos inyectables.
  - II.- Area aséptica de llenado de líquidos no penicilínicos inyectables.
  - III.- Area de fabricación de polvos penicilínicos orales.
  - IV.- Area de acondicionamiento de polvos penicilínicos orales e inyectables.
- Las demás áreas no penicilínicas se encuentran en el primer piso, figura no. 2
- V.- Area de manufactura de líquidos no penicilínicos inyectables.
  - VI.- Area aséptica de llenado de ampolletas de agua inyectable.
  - VII.- Area de acondicionamiento de líquidos no penicilínicos inyectables.

Las áreas I y II se encuentran separadas físicamente por la zona para el transportador de frascos viales, el cual surte a las dos áreas.

En ambas áreas existe un control para contaminación por medio de presiones diferenciales; el área de líquidos está sometida a una mayor presión que el área de polvos, por lo cual no permite el paso de polvo de una área a la otra.

El llenado de los antibióticos penicilínicos y no penicilínicos se desarrolla de acuerdo a un ciclo o programa específico, nunca se trabajan las dos áreas al mismo tiempo y previo al llenado de productos no penicilínicos se realiza una descontaminación, limpieza y sanitización del área.

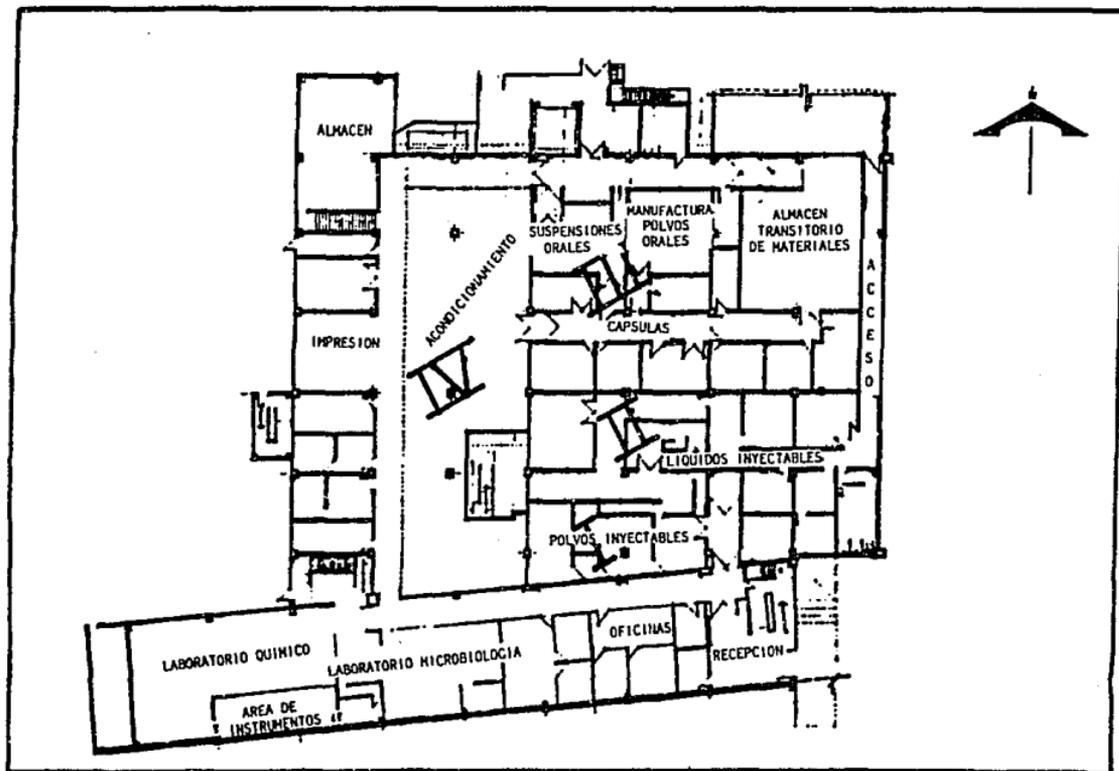


Figura 3.- Localización de las áreas de producción (planta baja)

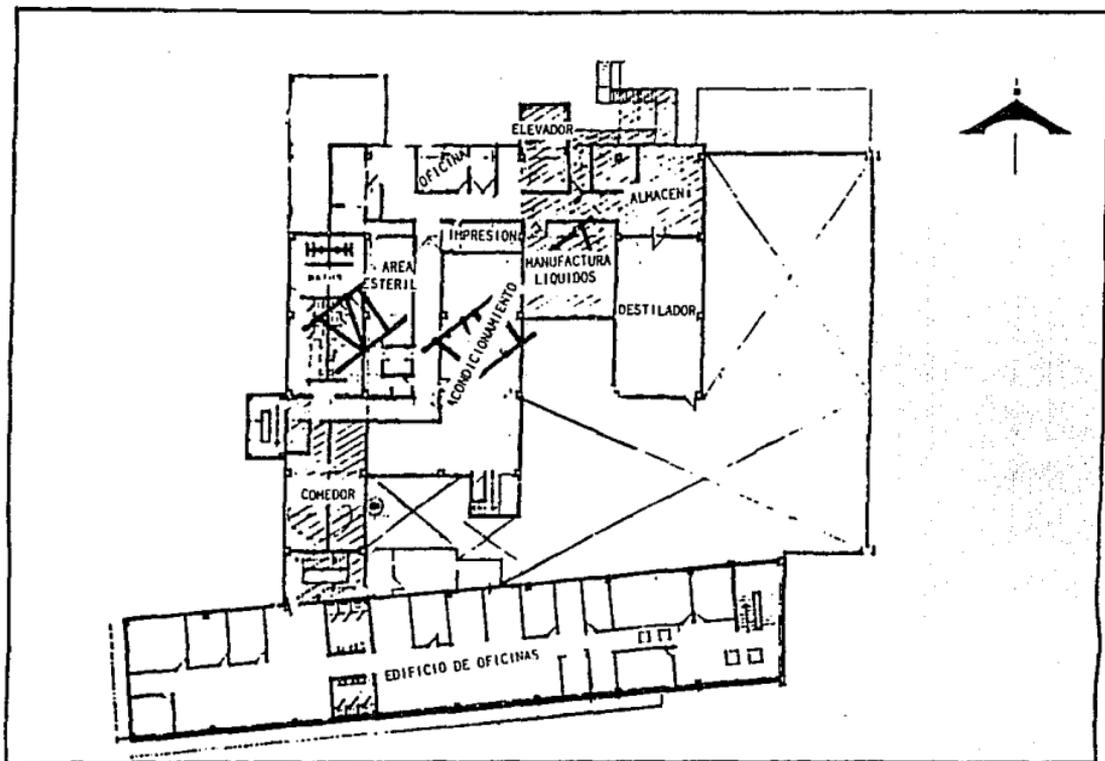


Figura 4.-Localización de las áreas de producción (primer piso)

## II.3 METODO MICROBIOLOGICO DE DETECCION DE TRAZAS DE PENICILINA

### II.3.1 DESCRIPCION DEL METODO DE DETECCION

#### II.3.1.1 REACTIVOS Y MATERIALES

- a) Sarcina lutea ATCC 9341
- b) penicilinasa (20,000 UL/ml/min)
- c) medio no. 1 para antibióticos
- d) peptona de caseína lecitina
- e) tween (polisorbato) 20
- f) hisopos estériles
- g) tubos de ensayo estériles

El material de vidrio se esteriliza por calor seco a 300°C durante 2 horas.

#### II.3.1.2 PREPARACIONES

- a) Preparar las cajas petri (SL y SLP) de acuerdo al anexo no. 1.
- b) Preparar la suspensión de Sarcina lutea de acuerdo al anexo no. 2.
- c) Preparar la solución salina estéril y la solución de PCLT de acuerdo al anexo no. 3.

#### II.3.1.3 MUESTREO

- a) Transportar los hisopos al área de trabajo donde se realizará el muestreo.
- b) Sacar del tubo de ensayo un hisopo previamente humedecido en solución de PCLT, muestrear frotando exhaustivamente el hisopo sobre un área de aproximadamente 10 x 10 cm.

c) Depositar el hisopo en el tubo correspondiente e identificar el tubo con la clave del sitio y área de trabajo muestreados.

d) Llevar las muestras al laboratorio para su siembra.

#### II.3.1.4 INOCULACION EN LAS CAJAS PETRI

En una campana de flujo laminar sacar el hisopo del tubo y sembrar por estría en una caja SL y posteriormente el mismo hisopo sembrarlo por estría en una caja SLP.

#### II.3.1.5 INCUBACION Y LECTURA DE LAS CAJAS PETRI

Incubar todas las cajas de petri junto con una caja control (sin inoculación de muestra) SL y otra caja control (sin inoculación de muestra) SLP a  $32 \pm 2$  °C de 18 a 24 hrs.

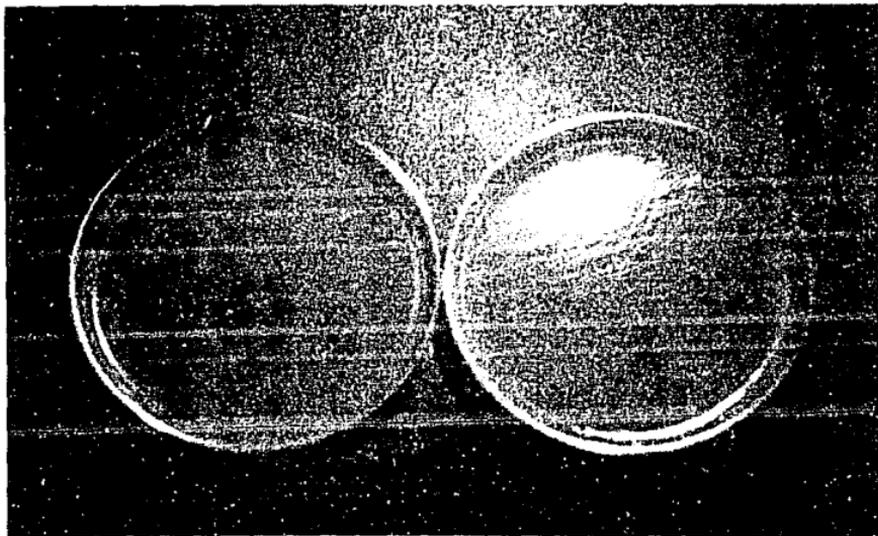
#### II.3.1.6 LECTURA DE LAS CAJAS DE PETRI

Determinar el grado de inhibición del crecimiento de la Sarcina lutea en base a la siguiente escala:

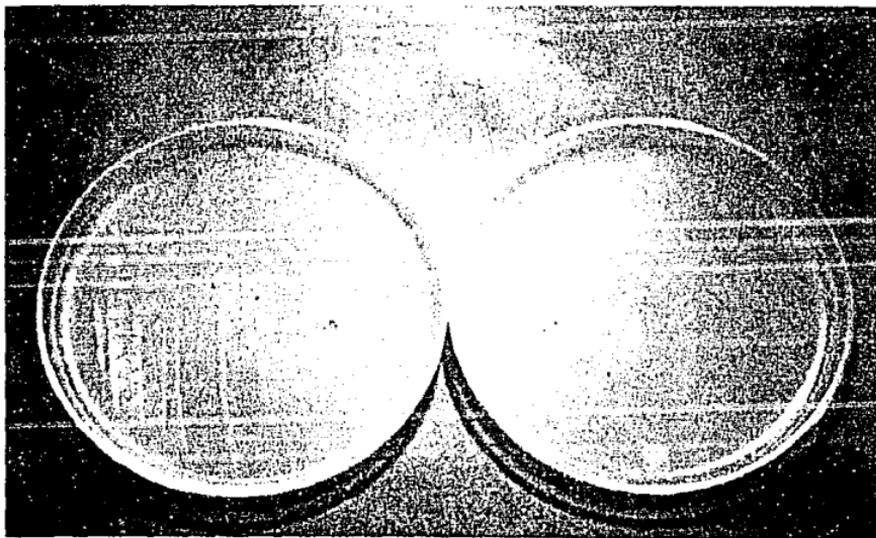
ESCALA ORDINAL DEL GRADO DE INHIBICION

DEL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO EN LAS CAJAS PETRI

LECTURA	VALOR ASIGNADO
Area de inhibición del crecimiento del indicador biológico ( <u>Sarcina lutea</u> ) del área total de la caja petri.	
No inhibición del crecimiento del indicador biológico del área total de la caja petri	0
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 1/4 del área total de la caja petri	1 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 2/4 del área total de la caja petri	2 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 3/4 del área total de la caja petri	3 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 4/4 del área total de la caja petri	4 +

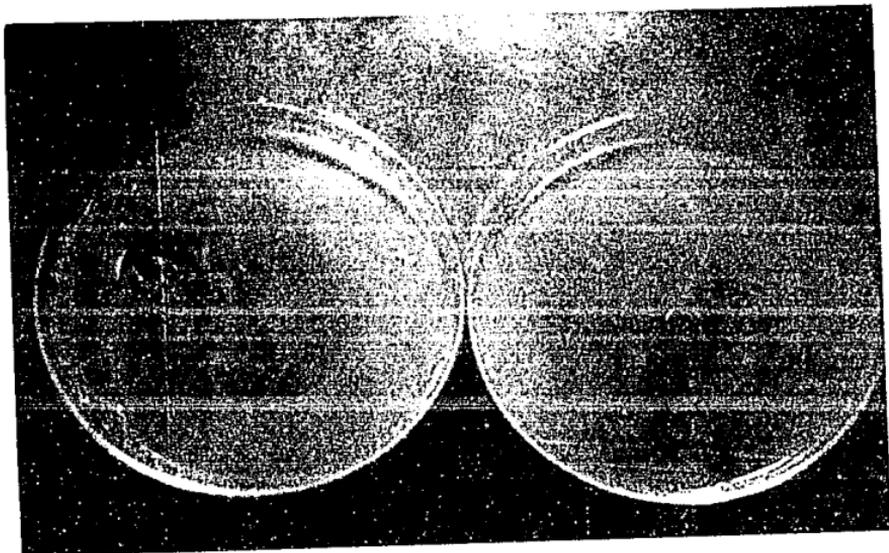


VALOR ASIGNADO 0

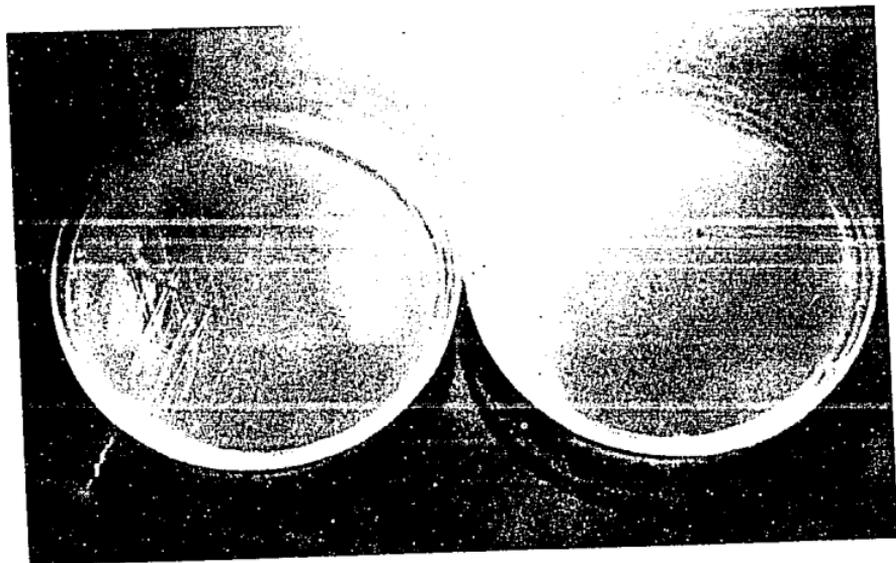


VALOR ASIGNADO 1 +

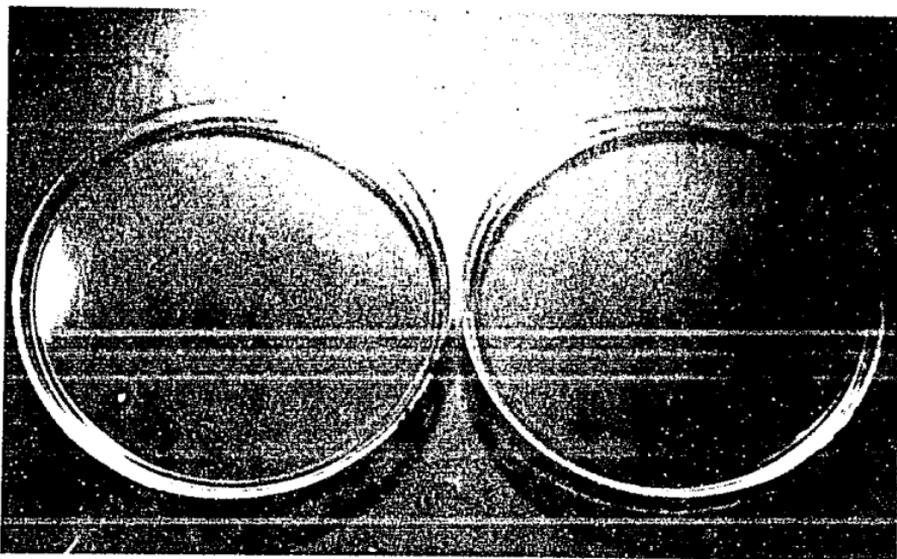
figura 5.- Grado de inhibición en las cajas petri



VALOR ASIGNADO 2 +



VALOR ASIGNADO 3 +



VALOR ASIGNADO 4 +

La figura no. 5 muestra la inhibición en la superficie de las cajas petri.

Las lecturas deben ser realizadas el menos por 5 analistas.

**NOTA:** Cualquier inhibición en el crecimiento de las cajas de los testigos, controles y SLP invalidan los resultados.

### **II.3.2 IDENTIFICACION DE LAS VARIABLES QUE AFECTAN LOS RESULTADOS**

Debido a la variabilidad que existe entre analistas, se consideran como variables que afectan a los resultados, el muestreo, la inoculación de la muestra en las cajas petri y la lectura del grado de inhibición.

a).- El muestreo ya que la frotación de la superficie no se lleva a cabo con la misma intensidad en todos los muestreos, y aún durante el mismo muestreo.

b).- La inoculación de la muestra es una variable que afecta a los resultados, debido a que la distribución en las cajas petri no siempre se lleva a cabo de una manera homogénea en la superficie de la caja.

c).- La lectura del grado de inhibición es una observación subjetiva que depende del analista.

### **II.3.3 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE OPERACION OPTIMAS**

Elección del vehículo inerte para realizar la validación del método, probar dos vehículos: solución de PCLT y cloroformo.

#### **II.3.3.1 ENSAYO PARA LA ELECCION DEL VEHICULO INERTE**

DIAGRAMA DE FLUJO: ELECCION DEL VEHICULO INERTE

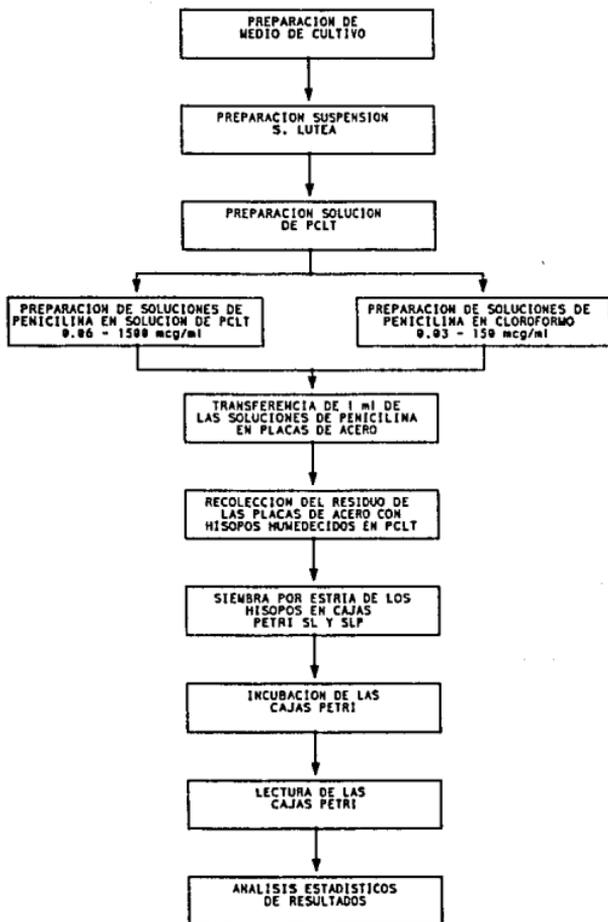


Figura No. 6

#### VEHICULO INERTE PCLT

Para las operaciones realizadas previamente al ensayo referirse a los anexos: 1, 2, 3, y 5.

1).- En una campana de flujo laminar, transferir 1 ml de la solución de 1500 µg/ml de penicilina a cada una de dos placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm (previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs); distribuir la solución en toda la superficie de las placas de acero e inmediatamente después recoger el residuo con hisopos humedecidos en solución de PCLT. Sembrar por estría los hisopos en cajas petri SL y SLP.

2).- Repetir por duplicado ambas operaciones para todas las concentraciones.

3).- En una campana de flujo laminar, transferir 1 ml de la solución de PCLT a cada una de dos placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs, distribuir la solución en toda la superficie de las placas de acero e inmediatamente después recoger el residuo con hisopos humedecidos en la misma solución. Sembrar por estría los hisopos, uno en una caja de petri SL (testigo SL) y otro en una caja de petri SLP (testigo SLP).

4).- Realizar las operaciones indicadas en el anexo no. 7

5).- Resultados y análisis

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla no. 2 Vehículo inerte PCLT.

Cantidad de Penicilina (µg)	Analista	20	03	06	11	Φ
	Cajas petri					
1 500	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
150	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
15	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
3	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
2.4	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
1.8	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
1.2	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.6	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.42	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4

Φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 3 Vehículo inerte PCLT.

Cantidad de Penicilina ( $\mu\text{g}$ )	Analista Cajas petri	20	03	06	11	$\phi$
		Grado de inhibición (en +)				
0.30	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.18	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.16	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.15	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.14	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.12	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.10	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.06	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0

$\phi$  = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de  $1/4 = 1 +$
- 3) Inhibición aproximadamente de  $2/4 = 2 +$
- 4) Inhibición aproximadamente de  $3/4 = 3 +$
- 5) Inhibición aproximadamente de  $4/4 = 4 +$

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 4. Tabla de contingencia vehiculo inerte PCLT.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ )	grado de inhibición (+)				
	0	1	2	3	4
1 500	0	0	0	0	2
150	0	0	0	0	2
15	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	2
2.4	0	0	0	0	2
1.8	0	0	0	0	2
1.2	0	0	0	0	2
0.6	0	0	0	0	2
0.42	0	0	0	0	2
0.30	0	0	0	0	2
0.18	0	0	0	0	2
0.16	2	0	0	0	0
0.15	2	0	0	0	0
0.14	2	0	0	0	0
0.12	2	0	0	0	0
0.10	2	0	0	0	0
0.06	2	0	0	0	0

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de  $1/4 = 1 +$
- 3) Inhibición aproximadamente de  $2/4 = 2 +$
- 4) Inhibición aproximadamente de  $3/4 = 3 +$
- 5) Inhibición aproximadamente de  $4/4 = 4 +$

( Referirse al anexo no. 7 )

En la tabla de contingencia para el vehiculo solución de PCLT se observa que la cantidad mínima de penicilina donde se presenta respuesta es de  $0.18 \mu\text{g}$ . Estableciendo un rango de respuesta de  $0.16$  a  $0.18 \mu\text{g}$ , con una amplitud de  $0.02 \mu\text{g}$ .

#### VEHICULO INERTE: CLOROFORMO

1).- En una campana de flujo laminar, transferir 1 ml de la solución de 150  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina a cada una de dos placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm (previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs); distribuir la solución en toda la superficie de la placa y esperar a que se evapore por completo el cloroformo de la superficie inmediatamente después recoger el residuo de la solución con hisopos humedecidos en solución de peptona de PCLT. Sembrar por estría los hisopos en cajas petri SL y SLP.

2).- Repetir por duplicado ambas operaciones para todas las concentraciones.

3).- En una campana de flujo laminar transferir 1 ml de cloroformo a cada una de 2 placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm (previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs); distribuir la solución en toda la superficie de las placas de acero e inmediatamente después recoger el residuo del cloroformo con hisopos humedecidos en solución de peptona de caseína-lecitina tween 20. Sembrar por estría un hisopo en una caja de petri SL (testigo SL) y el otro hisopo en una caja de petri SLP (testigo SLP).

4).- Realizar las operaciones indicadas en el anexo no. 7

5).- Resultados y análisis.

**TABLAS DE RESULTADOS**

Tabla no. 5 Vehículo inerte cloroformo.

Cantidad de Penicilina (µg)	Cajas petri	Analista				
		20	03	06	11	φ
		Grado de inhibición (en +)				
150	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
1.50	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
1.20	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.96	1 SL	4	4	4	4	4
	2 SL	4	4	4	4	4
0.75	1 SL	1	1	1	2	1
	2 SL	1	1	1	2	1
0.72	1 SL	3	3	3	3	3
	2 SL	0	0	0	2	0
0.60	1 SL	3	3	3	3	3
	2 SL	2	4	4	0	4
0.48	1 SL	1	0	1	1	1
	2 SL	1	1	1	1	1
0.45	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	3	3	3	3	3
0.30	1 SL	2	2	2	2	2
	2 SL	0	0	0	0	0

φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 6 Vehículo inerte cloroformo.

Cantidad de Penicilina (µg)	Cajas petri Analista	20	03	06	11	♦
		Grado de inhibición (en +)				
0.30	1 SL	3	4	4	4	4
	2 SL	3	4	3	4	4
0.30	1 SL	3	4	3	4	4
	2 SL	3	4	3	4	3
0.18	1 SL	1	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.15	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.15	1 SL	1	0	1	1	1
	2 SL	1	1	1	1	1
0.15	1 SL	1	1	1	1	1
	2 SL	1	1	1	1	1
0.15	1 SL	1	1	1	2	1
	2 SL	1	2	2	1	2
0.06	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.045	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0
0.030	1 SL	0	0	0	0	0
	2 SL	0	0	0	0	0

♦ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 7. Tabla de contingencia vehículo inerte: cloroformo.

cantidad penicilina (µg)	grado de inhibición (+)	0	1	2	3	4
		150	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	2	
1.5	0	0	0	0	2	
0.96	0	0	0	0	2	
0.75	0	2	0	0	0	
0.72	1	0	0	1	0	
0.60	0	0	0	1	1	
0.48	0	2	0	0	0	
0.45	1	0	0	1	2	
0.30	1	0	1	1	3	
0.18	2	0	0	0	0	
0.15	2	5	1	0	0	
0.06	2	0	0	0	0	
0.04	2	0	0	0	0	
0.03	2	0	0	0	0	

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

En la tabla de contingencia para el cloroformo observamos que la cantidad mínima de penicilina donde se obtiene respuesta es de 0.03 µg y se establece que para este vehículo el rango de respuesta es de 0.30 a 0.96 µg con una amplitud de 0.66 µg. Con base en el mayor rango y amplitud de respuesta que presenta el cloroformo, queda establecido éste como el mejor vehículo además de ser inerte a la penicilina y ser altamente volátil.

Debido a que la lectura del grado de inhibición es una variable que afecta la obtención de los resultados, se considera la moda de las lecturas realizadas por lo menos por cinco analistas, de esta manera se elimina el error por apreciación para cada analista.

#### II.3.4 VALIDACION

##### II.3.4.1 VALIDACION DEL SISTEMA

Para las operaciones realizadas previamente al ensayo, referirse a los anexos 1, 2, 3, y 4

1).- En una campana de flujo laminar, transferir 0.5 ml de la solución de 0.03  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina a una caja petri SL y sembrar por estría con un hisopo previamente humedecido con solución de PCLT; transferir 0.5 ml de solución de 0.03  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina a una caja petri SLP y sembrar por estría con un hisopo previamente humedecido con solución de PCLT.

2).- Repetir por sextuplicado ambas operaciones para todas las concentraciones.

3).- Sembrar por estría dos hisopos humedecidos con solución de PCLT uno en una caja petri SL (testigo SL) y el otro en una caja petri SLP (testigo SLP).

4).- Realizar las operaciones indicadas en el anexo no. 7

5).- Realizar cuatro ensayos en diferente día.

DIAGRAMA DE FLUJO: VALIDACION DEL SISTEMA

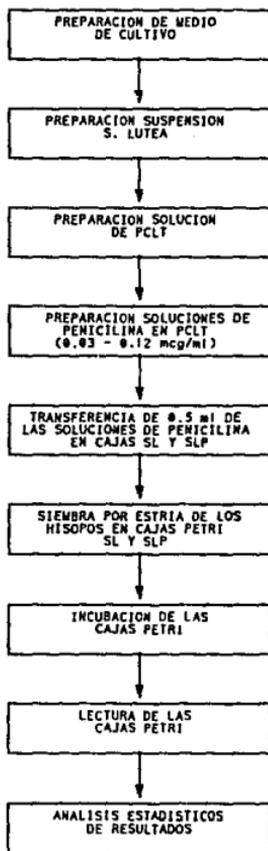


Figura No. 7

#### II.3.4.2 VALIDACION DEL METODO

Para las operaciones realizadas previamente al ensayo, referirse a los anexos (1, 2, 3, y 6)

1).- En una campana de flujo laminar, transferir 1 ml de la solución de 0.15 µg/ml de penicilina a cada una de dos placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm (previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs); distribuir la solución en toda la superficie de las placas de acero e inmediatamente después recoger el residuo con hisopos humedecidos en solución de PCLT.

2).- Sembrar por estría los hisopos en cajas petri SL y SLP.

3).- Repetir por duplicado ambas operaciones para todas las concentraciones.

4).- En una campana de flujo laminar, transferir 1 ml de la solución de PCLT a cada una de dos placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm previamente esterilizadas por calor seco a 300 °C durante 2 hrs, distribuir la solución en toda la superficie de las placas de acero e inmediatamente después recoger el residuo con hisopos humedecidos en la misma solución.

5).- Sembrar por estría dos hisopos uno en una caja de petri SL (testigo SL) y otro en una caja de petri SLP (testigo SLP).

6).- Realizar las operaciones indicadas en el anexo no. 7

7).- Realizar tres ensayos en diferente día.

DIAGRAMA DE FLUJO: VALIDACION DEL METODO

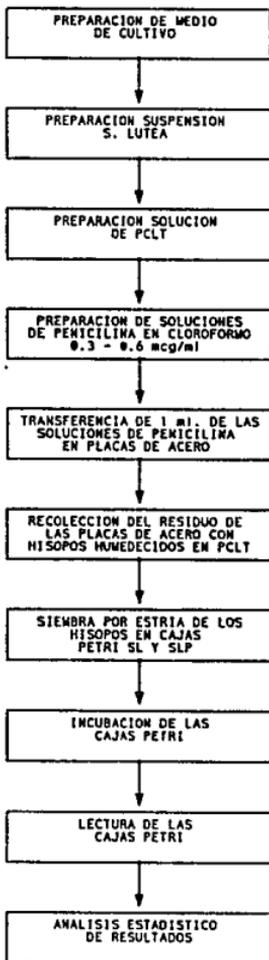


Figura No. 8

#### **II.3.4.3 ENSAYO PARA DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS DETERGENTES Y/O DESINFECTANTES SOBRE EL METODO DE DETECCION**

Para las operaciones realizadas previamente al ensayo referirse a los anexos 1, 2, 3, y 8

1).- Realizar la limpieza y desinfección de las placas de acero de acuerdo al anexo no. 8.

2).- Recoger el residuo de las placas de acero, con hisopos previamente humedecidos con solución de PCLT.

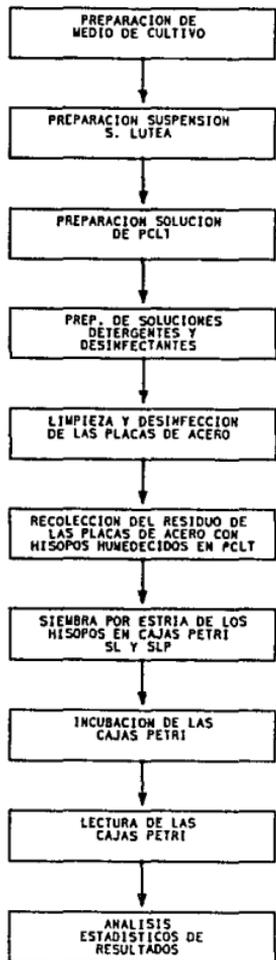
3).- Sembrar por estría en 6 cajas petri SL y 6 cajas petri SLP.

4).- Realizar las operaciones anteriores para todos los desinfectantes involucrados.

5).- Sembrar por estría dos hisopos humedecidos con solución de PCLT uno en una caja petri SL (testigo SL) y el otro en una caja petri SLP (testigo SLP).

6).- Realizar las operaciones indicadas en el anexo no. 7

**DIAGRAMA DE FLUJO:  
INFLUENCIA DE LOS DETERGENTES  
Y DESINFECTANTES SOBRE EL METODO**



**Figura No. 9**

# III RESULTADOS Y ANALISIS

## III.1 VALIDACION DEL SISTEMA

### III.1.1 TABLAS DE CONTINGENCIA

Para observar los resultados en el estudio, referirse a los anexos ( 9,10,11 y 12) respectivamente.

Tabla no. 8. Tabla de contingencia. Primer día, primer analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown	grado de inhibición ( + ) \diagup	0	1	2	3	4	$t_i$
0.015		6	0	0	0	0	6
0.030		0	2	4	0	0	6
0.045		0	0	1	5	0	6
0.060		0	0	2	2	2	6
$u_j$		0	2	7	7	2	
							n = 24

$u_j$  = Sumatoria de las columnas

$t_i$  = Sumatoria de los renglones

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 9. Tabla de contingencia. Primer día, segundo analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown grado de inhibición (+)	0	1	2	3	4	$t_i$
	0.015	1	4	1	0	0
0.030	0	1	3	2	0	6
0.045	0	0	3	3	0	6
0.060	0	0	0	3	3	6
$u_i$	1	5	7	8	3	
						$n = 24$

Tabla no. 10. Tabla de contingencia. Segundo día, primer analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown grado de inhibición (+)	0	1	2	3	4	$t_i$
	0.015	4	2	0	0	0
0.030	0	1	4	1	0	6
0.045	0	0	0	5	1	6
0.060	0	0	0	5	1	6
$u_i$	4	3	4	11	2	
						$n = 24$

$u_i$  = Sumatoria de las columnas

$t_i$  = Sumatoria de los renglones

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 11. Tabla de contingencia. Segundo día, segundo analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ )	grado de inhibición (+)					$t_i$
	0	1	2	3	4	
0.015	6	0	0	0	0	6
0.030	0	2	4	0	0	6
0.045	0	0	3	3	0	6
0.060	0	0	4	2	0	6
$u_i$	6	2	11	5	0	
						$n = 24$

$u_i$  = Sumatoria de las columnas

$t_i$  = Sumatoria de los renglones

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de  $1/4 = 1 +$
- 3) Inhibición aproximadamente de  $2/4 = 2 +$
- 4) Inhibición aproximadamente de  $3/4 = 3 +$
- 5) Inhibición aproximadamente de  $4/4 = 4 +$

( Referirse al anexo no. 7 )

### III.1.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOMMERS ( $\delta$ ) PARA EL SISTEMA

Tabla no. 12. Valores de delta de Sommers ( $\delta$ ) para cada una de las tablas de contingencia del sistema.

Tabla	2 S	$n^2 - \Sigma t^2$	$\delta$
8	344	432	0.796
9	324	432	0.750
10	336	432	0.778
11	292	432	0.676

### III.1.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE JONCKHEERE PARA EL SISTEMA

Tabla no. 13. Valores de  $u_i$  y  $t_i$  de las tablas de contingencia del sistema.

Tabla	$u_1$	$u_2$	$u_3$	$u_4$	$u_5$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$
8	6	2	7	7	2	6	6	6	6
9	1	5	7	8	3	6	6	6	6
10	4	3	4	11	2	6	6	6	6
11	6	2	11	5	0	6	6	6	6

Tabla no. 14. Valores de  $n^n$ ,  $\Sigma u^2$ ,  $\Sigma u^3$ ,  $\Sigma t^2$  y  $\Sigma t^3$  de las tablas de contingencia para el sistema.

Tabla	$n^3$	$n^2$	$\Sigma u^2$	$\Sigma u^3$	$\Sigma t^2$	$\Sigma t^3$
8	13824	576	142	918	144	864
9	13284	576	148	1008	144	864
10	13284	576	166	1494	144	864
11	13284	576	186	1680	144	864

Tabla no. 15. Resultados de la prueba de Jonckheere de cada tabla de contingencia para el sistema.

Tabla	P	Q	S	$s^2$	$Z_C$	$Z_t^*$
8	182	10	172	1408.1976	4.58	2.58
9	169	7	162	1339.7783	4.69	2.58
10	173	5	168	1285.0198	4.68	2.58
11	158	12	146	1263.7470	4.11	2.58

\* =  $\alpha = 0.005$

### III.1.4 ANALISIS

Los resultados de la prueba de Sommers (22) para medir la asociación entre las variables se muestran en la tabla 12. Los valores de la delta de Sommers nos indican la probabilidad de predecir el grado de inhibición dado el valor de la cantidad de penicilina para cada curva respectiva. En la actualidad no existe un criterio de aceptación de esta medida de asociación para este caso específico de variables, pero debido a la naturaleza del método, la asociación puede considerarse como aceptable.

Los resultados de la prueba de Jonckheere para determinar la linealidad del sistema se encuentran en la tabla 15. Para las cuatro curvas se tiene un valor de  $Z_c$  mayor al de  $Z_t$  0.995, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, es decir sí existe una asociación directamente proporcional entre la cantidad de penicilina con el grado de inhibición del indicador biológico (Sarcina lutea) en la caja petri. Por lo tanto y con base a que los ensayos se realizaron con diferentes analistas y diferentes días se establece que la asociación entre las variables es confiable, lineal y reproducible (22).

El límite de detección del sistema se obtuvo con base a las tablas de contingencia (tablas 8 a 11) de las 4 curvas realizadas. En estas se observan que la respuesta de 0 en el grado de inhibición del indicador biológico (no inhibición del crecimiento del microorganismo en la caja petri), no presenta ningún valor en las cantidades de 0.03, 0.045, y 0.06  $\mu\text{g}$  de penicilina, y en

todas las tablas de contingencia la cantidad de 0.015  $\mu\text{g}$  de penicilina presenta al menos una caja, en la cual se informó como grado de inhibición cero (no presencia de penicilina), dada la definición de límite de detección "mínima cantidad que nos permite detectar una sustancia de interés, utilizando una metodología dada", se puede establecer de manera conservadora un límite de detección del sistema de 0.03  $\mu\text{g}$  de penicilina. Este límite se puede considerar como aceptable, tomando en cuenta que en la metodología sugerida por la FDA (7) para la detección de residuos penicilínicos en medicamentos, una de las concentraciones empleadas en la curva es equivalente al límite de detección del método evaluado.

### III.2 VALIDACION DEL METODO

#### III.2.1 TABLAS DE CONTINGENCIA

Tabla no. 16. Tabla de contingencia. Primer día, primer analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown grado de inhibición (+)	0	1	2	3	4	$t_i$
0.015	3	1	1	1	0	6
0.030	3	1	2	0	0	6
0.045	0	0	0	3	3	6
0.060	0	0	0	2	4	6
$u_i$	6	2	3	6	7	
						$n = 24$

$u_i$  = Sumatoria de las columnas

$t_i$  = Sumatoria de los renglones

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de  $1/4 = 1 +$
- 3) Inhibición aproximadamente de  $2/4 = 2 +$
- 4) Inhibición aproximadamente de  $3/4 = 3 +$
- 5) Inhibición aproximadamente de  $4/4 = 4 +$

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 17. Tabla de contingencia. Primer día, segundo analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown	grado de inhibición (+)					$t_i$
	0	1	2	3	4	
0.015	0	5	0	0	1	6
0.030	2	0	2	0	2	6
0.045	0	1	0	3	2	6
0.060	0	0	1	3	2	6
$u_i$	2	6	3	6	7	
						$n = 24$

Tabla no. 18. Tabla de contingencia. Segundo día, primer analista.

cantidad penicilina ( $\mu\text{g}$ ) \diagdown	grado de inhibición (+)					$t_i$
	0	1	2	3	4	
0.015	1	1	2	2	0	6
0.030	0	3	0	2	1	6
0.045	1	0	1	1	3	6
0.060	0	0	1	3	2	6
$u_i$	2	4	4	8	6	
						$n = 24$

$u_i$  = Sumatoria de las columnas

$t_i$  = Sumatoria de los renglones

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la *S. lutea*:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de  $1/4 = 1 +$
- 3) Inhibición aproximadamente de  $2/4 = 2 +$
- 4) Inhibición aproximadamente de  $3/4 = 3 +$
- 5) Inhibición aproximadamente de  $4/4 = 4 +$

( Referirse al anexo no. 7 )

### III.2.2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOMMERS PARA EL METODO

Tabla no. 19. Valores de delta de Sommers ( $\delta$ ) para cada una de las tablas de contingencia del método.

Tabla	2 S	$n^2 - \Sigma t^2$	$\delta$
16	286	432	0.662
17	180	432	0.416
18	138	432	0.319

### III.2.3 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE JONCKHEERE

Tabla no. 20. Valores de  $u_i$  y  $t_i$  de las tablas de contingencia del método.

Tabla	$u_1$	$u_2$	$u_3$	$u_4$	$u_5$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$
16	6	2	3	6	7	6	6	6	6
17	2	6	3	6	7	6	6	6	6
18	2	4	4	8	6	6	6	6	6

Tabla no. 21. Valores de  $n^n$ ,  $\Sigma u^2$ ,  $\Sigma u^3$ ,  $\Sigma t^2$  y  $\Sigma t^3$  de las tablas de contingencia del método.

Tabla	$n^3$	$n^2$	$\Sigma u^2$	$\Sigma u^3$	$\Sigma t^2$	$\Sigma t^3$
16	13284	576	134	810	144	864
17	13284	576	134	810	144	864
18	13284	576	136	864	144	864

Tabla no. 22. Resultados de la prueba de Jonckheere de cada tabla de contingencia para el método.

Tabla	P	Q	S	$s^2$	$Z_c$	$Z_t^{**}$
16	162	19	143	1369.2925	3.88	1.645
17	131	41	90	1360.2925	2.44	1.645
18	119	50	69	1354.3874	1.87	1.645

\*\* =  $\alpha$  = 0.05

### III.2.4 ANALISIS

Los resultados de la delta de Sommers ( $\delta$ ) para el método se encuentran en la tabla 19. Estos valores nos indican que existe una probabilidad de  $\delta$  de predecir el grado de inhibición de la muestra dado el valor de la cantidad de penicilina, utilizando la curva respectiva. Debido a la naturaleza del método, la asociación puede considerarse como aceptable.

Los resultados de la prueba de Jonckheere para determinar la linealidad del método se muestran en la tabla 22. Para las tres curvas el valor de  $Z_c$  es mayor al de  $Z_t$  0.95, por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir sí existe una asociación significativa entre la cantidad de penicilina con el grado de inhibición del indicador biológico en la muestra. Por lo anterior se establece que la asociación aparte de ser confiable y lineal, es reproducible bajo distintas condiciones (diferente analista en diferente día).

El límite de detección del método se obtuvo con base a los resultados de las tablas de contingencia de las tres curvas. En estas se observa que la respuesta de 0 en el grado de inhibición del indicador biológico no presenta ninguna valor en la cantidad de 0.45 y 0.6  $\mu\text{g}$  de penicilina para la tabla 16 (de contingencia); de 0.15, 0.45 y 0.6  $\mu\text{g}$  para la tabla 17 (de contingencia); y de 0.3 y 0.6  $\mu\text{g}$  para la tabla 18 (de contingencia); y en base a la definición de límite de detección, se establece de manera conservadora un límite de detección del método de 0.6  $\mu\text{g}$  de penicilina. Este límite se puede considerar como aceptable, tomando en cuenta que en la metodología sugerida por la FDA (7) para la detección de residuos penicilínicos en medicamentos, una de las cantidades empleadas en la curva es equivalente a diez veces el límite de detección reportado para el método evaluado.

El método presenta un límite de detección mayor al del sistema y una asociación entre las variables ( $\delta$ ) menor, debido a que este involucra operaciones adicionales que influyen en la determinación de dichos parámetros, tales como:

- a) El muestreo del beta-lactámico en una superficie, con ayuda de un hisopo empapado en un vehículo inerte.
  
- b) La siembra del contenido del hisopo a una caja previamente inoculado con el indicador biológico.

Considerando además que el cloroformo permitió adherir una cantidad conocida de penicilina en una superficie de acero inoxidable, la cual debe presentar mayor resistencia al muestreo que el polvo depositado por caída, en las áreas de producción. En realidad el polvo penicilínico se deposita en las paredes, pisos, equipo, etc., más no se adhiere; por lo tanto como se esperaba el límite de detección del método fué mayor al del sistema.

### **III.3 INFLUENCIA DE LOS DETERGENTES Y DESINFECTANTES SOBRE LA DETECCION DE TRAZAS DE PENICILINA.**

En el presente estudio se evaluaron sanitizantes que son empleados actualmente en las áreas no penicilínicas de la planta, reproduciendo a nivel de laboratorio el procedimiento de descontaminación y desinfección de las áreas de producción.

Los resultados obtenidos para cada sanitizante se encuentran en la tabla 23, estos se encuentran agrupados en base a la moda y amplitud de cada uno. Para considerar que los sanitizantes empleados no influyen en el método de detección de trazas, estos no deben inhibir el crecimiento (grado de inhibición cero) del indicador biológico en las cajas SL y SLP ó no inhibir el crecimiento del indicador biológico en la placa SL pero si observar inhibición en la placa SLP; si estos influyen se espera que haya inhibición del crecimiento (grado de inhibición 1,2,3 ó 4) del indicador biológico tanto en la placa SL como en la SLP, en base a esto los sanitizantes que no influyen en el método de

detección de trazas son el hipoclorito de sodio y el germigen, no así el benzal, sanizol al 50 %, sanizol al 80 %, sanitizer y LPH (ver tabla 24); pero aún así el método debe considerarse confiable ya que el empleo de placas SLP permite detectar los positivos falsos (presencia de una sustancia no penicilínica capaz de inhibir el crecimiento de la Sarcina lutea), es decir permite establecer la presencia verdadera del beta-lactámico. Con estos resultados se diseñó la tabla 25, en la cual se presentan los diferentes casos que presentan los resultados, su interpretación y la confiabilidad de estos.

Tabla no. 23. Resultados de la moda y amplitud del grado de inhibición obtenidos en las 6 cajas para los diferentes sanitizantes y detergentes.

		MODA (AMPLITUD) DE LAS 6 CAJAS	
		CAJAS SL	CAJAS SLP
S A N I T I Z A N T E	BENZAL	4 (0)	4 (0)
	HIPOCLORITO DE SODIO (3%)	0 (0)	0 (0)
	GERMI-GEN	0 (0)	0 (0)
	SANIZOL AL 80 %	4 (0)	4 (0)
	SANITIZER	4 (0)	4 (0)
	SANIZOL AL 50 %	4 (0)	4 (0)
	LPH	0 (3)	0 (4)

Tabla no. 24. Influencia de los sanitizantes y detergentes sobre el método de detección de trazas de penicilina.

SANITIZANTE	INFLUENCIA	
	(SI)	(NO)
BENZAL	*	
HIPOCLORITO DE SODIO (3%)		*
GERMI-GEN		*
SANIZOL AL 80 ‰	*	
SANIZOL AL 50 ‰	*	
SANITIZER	*	
LPH	*	

Tabla no. 25. Diferentes casos que se presentan en los resultados obtenidos de las lecturas de las cajas petri y su interpretación.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO			
CASO	PLACA SL	PLACA SLP	INTERPRETACION
1	SI	NO	PRESENCIA DE BETA-LACTAMICO (POSITIVO-VERDADERO)
2	SI	SI	PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA CON ACTIVIDAD GERMICIDA PERO NO BETA-LACTAMICO (POSITIVO-FALSO)
3	NO	SI	PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA NO BETA-LACTAMICO QUE AL INTERACTUAR CON LA ENZIMA PENASA PRODUCE ACTIVIDAD GERMICIDA.
4	NO	NO	NO PRESENCIA DE BETA-LACTAMICO (NEGATIVO-VERDADERO).

Aplicando la tabla 25 en términos de control ambiental, el caso 1 es el esperado cuando existe contaminación en superficies con penicilina, por lo que se requiere de una acción correctiva (suspender el proceso de fabricación y descontaminar el área de producción). El caso 4 es el esperado cuando no existe contaminación de penicilina indicando que el área está bajo control ambiental. El caso 2 es especial, ya que una inhibición total en ambas placas indica la presencia de una sustancia con actividad germicida no penicilínica; una inhibición total de la placa SL y parcial de la placa SLP indica una mezcla de una sustancia penicilínica y una sustancia no penicilínica con actividad germicida (sugiere acción correctiva); y una inhibición parcial de la placa SL y total de la placa SLP sugiere la presencia de una sustancia no penicilínica con actividad germicida. El caso 3 que en teoría no debe ocurrir o ocurrir con una frecuencia baja indica la presencia de una sustancia que al reaccionar con la enzima penicilinasa provoca actividad germicida.

#### IV CONCLUSIONES

1).- El sistema es lineal y reproducible bajo las condiciones de diferente analista y diferente día, con un límite de detección de 0.03 µg de penicilina.

2).- El método de detección de trazas de penicilina en superficies en áreas no penicilínicas es lineal y reproducible, con un límite de detección de 0.6 µg de penicilina.

3).- Los sanitizantes hipoclorito de sodio (3 %), germigen y cidex, así como el detergente pex-biolab no influyen en la detección de trazas de penicilina en superficies empleando el método microbiológico de detección de trazas de penicilina en superficies con Sarcina lutea.

4).- Los sanitizantes Benzal, Sanitizer, LPH, Sanizol al 50 % y Sanizol al 80 % si influyen en la detección de trazas de penicilina en superficies dando lugar a resultados positivos falsos por la presencia de una sustancia con actividad germicida.

5).-En base a los resultados obtenidos en este estudio es recomendable que se evalúe la especificidad del método probando concentraciones conocidas de penicilina en superficies y limpiando dichas superficies con los detergentes y desinfectantes empleados, para determinar si estos causan interferencia en la detección de trazas.

6).- También es necesario que se realice la validación del método de detección de trazas de penicilina en productos no penicilínicos, para asegurar que los productos no están contaminados, aún cuando no se detecten trazas de penicilina en las áreas de fabricación no penicilínicas.

7).- Es recomendable el empleo de un método cuantitativo con mayor sensibilidad para la determinación de trazas de penicilina.

#### **Y VENTAJAS DEL ESTUDIO**

1).- Permite la evaluación retrospectiva de los niveles de contaminación en las áreas no penicilínicas de la planta.

2).- Permite establecer límites de control en las áreas no penicilínicas con base al límite de detección del método para la toma de acciones correctivas.

#### **VI DESVENTAJAS DEL ESTUDIO**

1).- El método no permite cuantificar de una manera exacta trazas de penicilina.

2).- El método no garantiza la detección de trazas de penicilina en cantidades menores a  $0.6 \mu\text{g}$

ANEXO NO. 1

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

a).- MEDIO NUMERO UNO PARA ANTIBIOTICOS .

Suspender 30.5 g de polvo deshidratado del medio número uno para antibióticos en un litro de agua destilada, dejar humectar de 10 a 15 minutos, calentar a ebullición agitando frecuentemente y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, 15 minutos.

b).- CAJAS DE PETRI CON MEDIO NUMERO UNO PARA ANTIBIOTICOS .

- CAJAS DE PETRI SL

Inocular asépticamente en campana de flujo laminar 1 ml de suspensión de Sarcina lutea (preparada como se indica en el anexo no. 2) por cada litro de medio número uno para antibióticos, colocar 20 ml del medio inoculado en cada caja petri, dejar solidificar. Mantener en refrigeración.

- CAJAS DE PETRI SLP

Inocular asépticamente en campana de flujo laminar 1 ml de suspensión de Sarcina lutea (preparada como se indica en el anexo no. 2) por cada litro de medio número uno para antibióticos, agregar al medio inoculado 1 ml de penicilinas concentrada (10,000 UI/ml) por cada litro de medio y proceder a colocar 20 ml en cada caja petri, dejar solidificar. Mantener en refrigeración.

c).- TUBOS DE SIEMBRA .

Colocar asépticamente en campana de flujo laminar 40 ml de medio número uno para antibióticos en tubos de ensayo no. 9820 de 19.5 x 3.7 cm, esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, 15 minutos y dejar solidificar en posición inclinada.

Una vez solidificado el medio de los tubos, se siembra en condiciones asépticas la cepa pura de Sarcina lutea ATCC 9341, se incuban los tubos a 32 +/- 2 °C de 18 a 24 hrs. Mantener en refrigeración los tubos en donde se observan colonias amarillas brillantes que cubren por completo la superficie del medio.

## ANEXO NO. 2 PREPARACION DE SUSPENSIONES

### SUSPENSION DE Sarcina lutea ATCC 9341

Agregar 20 ml de solución salina estéril a un tubo de siembra recientemente preparado y agitar hasta desprender el microorganismo de la superficie del medio. (Referirse al anexo no. 14). Separar la suspensión y ajustarla con solución salina estéril a 0.8% de transmitancia a 530 nm en un espectrofotómetro.

### ANEXO NO. 3 PREPARACION DE SOLUCIONES

#### 1).- SOLUCION SALINA ESTERIL

Transferir 0.9 g de NaCl a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y llevar al volumen con agua destilada; distribuir en tubos de ensayo con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, 15 minutos.

#### 2).- SOLUCION DE PEPTONA DE CASEINA LECITINA POLISORBATO (TWEEN) 20

Suspender 25 g de peptona de caseína-lectina en 0.96 litros de agua destilada y calentar en baño maría a 50 °C durante aproximadamente 30 minutos, hasta disolución completa. A continuación añadir 40 ml de polisorbato (tween) 20 y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, 15 minutos.

ANEXO NO. 4

PREPARACION DE SOLUCIONES DE PENICILINA G POTASICA DE DIFERENTE  
CONCENTRACION, PARA EVALUAR AL SISTEMA

CONCENTRACIONES: 0.03, 0.06, 0.09 Y 0.12  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{0.0157 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 1500 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1500 \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 15 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{15 \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 1.5 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1.5 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.03 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1.5 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.06 \mu\text{g/ml}$$

$$2 \text{ ml} \times \frac{1.5 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.12 \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.09 \mu\text{g/ml}$$

## ANEXO NO. 5

## PREPARACION DE SOLUCIONES DE DIFERENTE CONCENTRACION DE PENICILINA G POTASICA, PARA ELEGIR EL VEHICULO INERTE

## a) SOLUCIONES EN PEPTONA DE CASEINA LECITINA TWEEN 20.

CONCENTRACIONES: 1500  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , 3.0  $\mu\text{g/ml}$ , 2.4  $\mu\text{g/ml}$ , 1.8  $\mu\text{g/ml}$ , 1.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.6  $\mu\text{g/ml}$ , 0.42  $\mu\text{g/ml}$ , 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , 0.18  $\mu\text{g/ml}$ , 0.15  $\mu\text{g/ml}$ , 0.16  $\mu\text{g/ml}$ , 0.14  $\mu\text{g/ml}$ , 0.12  $\mu\text{g/ml}$ , 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , y 0.06  $\mu\text{g/ml}$ .

$$\frac{0.0157 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 1500 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1500 \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 150 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{150 \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 15 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{150 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 3 \mu\text{g/ml}$$

$$4 \text{ ml} \times \frac{15 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 2.4 \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{15 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 1.8 \mu\text{g/ml}$$

$$2 \text{ ml} \times \frac{15 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 1.2 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{15 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{150 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$7 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.42 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$5 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.3 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.18 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{15 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 0.15 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0.0105 \text{ g}}{10 \text{ ml}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$5 \text{ ml} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{100 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 1 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$4 \text{ ml} \times \frac{1 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.16 \mu\text{g/ml}$$

$$7 \text{ ml} \times \frac{1 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.14 \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1 \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.12 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1 \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.1 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{3 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.06 \mu\text{g/ml}$$

b) SOLUCIONES EN CLOROFORMO

CONCENTRACIONES 150  $\mu\text{g/ml}$ , 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , 1.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.96  $\mu\text{g/ml}$ , 0.75  $\mu\text{g/ml}$ , 0.72  $\mu\text{g/ml}$ , 0.60  $\mu\text{g/ml}$ , 0.48  $\mu\text{g/ml}$ , 0.45  $\mu\text{g/ml}$ , 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , 0.18  $\mu\text{g/ml}$ , 0.15  $\mu\text{g/ml}$ , 0.06  $\mu\text{g/ml}$ , 0.045  $\mu\text{g/ml}$ , 0.03  $\mu\text{g/ml}$ .

$$\frac{0.0157 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 150 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{150 \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 1.5 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0.01256 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 120 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{120 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$20 \text{ ml} \times \frac{1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.96 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$15 \text{ ml} \times \frac{1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.72 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$4 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{1.2 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.48 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.45 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$2 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.3 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.18 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{25 \text{ ml}} = 0.06 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 0.045 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.03 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ANEXO NO. 6

PREPARACION DE SOLUCIONES DE DIFERENTES CONCENTRACION DE  
PENICILINA G POTASICA, PARA EVALUAR EL METODO

SOLUCIONES EN CLOROFORMO COMO VEHICULO INERTE

CONCENTRACIONES: 0.15  $\mu\text{g/ml}$ , 0.30  $\mu\text{g/ml}$ , 0.45  $\mu\text{g/ml}$  y 0.60  $\mu\text{g/ml}$ .

$$\frac{0.0157 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = 150 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{150 \text{ } \mu\text{g/ml}}{100 \text{ ml}} = 1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$3 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.45 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$20 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$10 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 0.3 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{10 \text{ ml}} = 0.15 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

ANEXO NO. 7

INCUBACION Y LECTURA DE LAS CAJAS PETRI

a).- INCUBACION DE LAS CAJAS DE PETRI

Incubar todas las cajas de petri junto con una caja control (sin inoculación de muestra) SL y otra caja control (sin inoculación de muestra) SLP a 32 +/- 2 °C de 18 a 24 hrs.

b).- LECTURA DE LAS CAJAS DE PETRI

Determinar el grado de inhibición del crecimiento de la Sarcina lutea en base a la siguiente escala:

ESCALA ORDINAL DEL GRADO DE INHIBICION  
DEL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO EN LAS CAJAS PETRI

LECTURA	VALOR ASIGNADO
Area de inhibición del crecimiento del indicador biológico ( <u>Sarcina lutea</u> ) del área total de la caja petri	
No inhibición del crecimiento del indicador biológico del área total de la caja petri	0
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 1/4 del área total de la caja petri	1 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 2/4 del área total de la caja petri	2 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 3/4 del área total de la caja petri	3 +
Inhibición del crecimiento del indicador biológico en 4/4 del área total de la caja petri	4 +

La figura no. 5 muestra la inhibición en la superficie de las cajas petri.

Las lecturas deben ser realizadas el menos por 5 analistas.

Cualquier inhibición en el crecimiento de las cajas de los testigos, controles y SLP invalidan los resultados.

ANEXO NO. 8

LIMPIEZA Y DESINFECCION DE PLACAS DE ACERO

1.- PREPARACION DE SOLUCIONES DE DETERGENTES Y DESINFECTANTES

a).- SOLUCION DE DETERGENTE PEX-BIOLAB

Transferir 36 g de detergente y llevar a 4 litros con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

b).- SOLUCIONES DESINFECTANTES

1.- LPH: Transferir 100 ml de desinfectante LPH y llevar a 256 ml con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

2.- PRESEPT: Transferir 560 mg de desinfectante PRESEPT disolver y llevar a 1 litro con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

3.- SANITIZER I: Transferir 2 ml de SANITIZER I y llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

4.- SANIZOL al 50 ‰ : Transferir 20 ml de SANIZOL y llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

5.- SANIZOL al 80 ‰ : Transferir 50 ml de SANIZOL y llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

6.- GERMIGEN: Transferir 0.15 ml de GERMIGEN y llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar a través de membrana 0.22 micras.

7.- CIDEX (GLUTARALDEHIDO): Transferir 2.0 g de polvo en el vehículo c.b.p. 100 ml.

8.- HIPOCLORITO DE SODIO: Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 3%.

## 2.- LIMPIEZA Y DESINFECCION DE PLACAS DE ACERO

### 1).- Limpieza de las placas de acero

En una campana de flujo laminar efectuar la limpieza de 12 placas de acero inoxidable de 10 x 10 cm (previamente esterilizadas por calor seco a 300°C durante 2 hrs)

a).- Humedecer una esponja estéril en una primer solución del detergente pex-biolab y limpiar la superficie de las placas.

b).- Humedecer la esponja estéril en una segunda solución del detergente pex-biolab y limpiar la superficie de las placas nuevamente.

c).- Humedecer la esponja en agua destilada filtrada a través de membrana 0.22 micras y limpiar nuevamente la superficie de las placas.

### 2).- Desinfección de las placas de acero

a).- Humedecer una esponja estéril en una primera solución del desinfectante correspondiente y desinfectar la superficie de las placas.

b).- Humedecer una esponja estéril en una segunda solución del desinfectante correspondiente y desinfectar la superficie de las placas.

c).- Exponer las placas a nebulización con Cidex durante 15 minutos.

Dejar las placas expuestas, en flujo laminar durante 12 horas.

## ANEXO NO. 9

## TABLAS DE RESULTADOS PARA LA EVALUACION DEL SISTEMA

La confiabilidad de los resultados obtenidos para la evaluación del sistema, método y elección del disolvente, se establecieron en base a los resultados de las placas TSL, TSLP, CSL y CSLP, ya que en estas cajas no se reportó inhibición del crecimiento del indicador biológico; por lo que únicamente se enlistan los resultados para las cajas SL y SLP de cada una de las curvas respectivas, así como la moda del grado de inhibición.

I CANTIDAD DE PENICILINA: 0.015 µg

Tabla no. 26. Primer día, primer analista

Caja petri \ Analista	13	12	21	03	20	♠
	Grado de inhibición (en +)					
1 SL	0	0	0	0	0	0
2 SL	0	0	0	0	0	0
3 SL	0	0	0	0	0	0
4 SL	0	0	0	0	0	0
5 SL	0	0	0	0	0	0
6 SL	0	0	0	0	0	0

♠ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lytea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 27. Primer día, segundo analista.

Caja petri	Analista						♠
	13	03	20	06	02		
	Grado de inhibición (en +)						
1 SL	0	1	0	1	1	0	0
2 SL	2	2	2	2	2	0	0
3 SL	2	1	0	1	1	0	0
4 SL	0	1	0	0	0	0	0
5 SL	1	1	0	1	1	0	0
6 SL	2	2	1	1	1	0	0

Tabla no. 28. Segundo día, primer analista.

Caja petri	Analista									♠
	13	03	06	02	20	12	17	11	16	
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
2 SL	1	1	2	0	0	1	2	1	1	1
3 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

♠ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 29. Segundo día, segundo analista.

Caja petri	Analista						11	φ		
	13	20	12	17	16	08			03	
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0
2 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 SL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

II CANTIDAD DE PENICILINA: 0.030 µg

Tabla no. 30. Primer día, primer analista.

Caja petri	Analista					φ
	13	12	21	03	20	
	Grado de inhibición ( en +)					
1 SL	2	3	2	2	2	2
2 SL	2	2	2	2	2	2
3 SL	2	2	2	2	2	2
4 SL	1	2	2	1	1	1
5 SL	2	3	2	2	2	2
6 SL	1	1	1	1	1	1

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 31. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista						ϕ
	13	03	20	06	02		
	Grado de inhibición (en +)						
1 SL	3	3	3	2	3	3	3
2 SL	2	2	2	2	2	2	2
3 SL	2	2	1	2	2	2	2
4 SL	1	2	0	1	1	1	1
5 SL	2	2	2	2	3	3	2
6 SL	3	3	3	3	3	3	3

Tabla no. 32. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista									ϕ
	13	03	06	02	20	12	17	11	16	
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2
2 SL	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
3 SL	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
4 SL	3	3	2	2	1	3	2	2	2	2
5 SL	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
6 SL	1	2	2	0	1	1	1	2	1	1

ϕ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 33. Segundo día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista									
	13	20	12	17	16	08	03	02	11	♣
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2
2 SL	1	2	0	0	1	2	2	1	1	1
3 SL	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2
4 SL	1	2	2	0	1	2	2	2	1	2
5 SL	1	1	2	0	1	1	2	1	1	1
6 SL	2	3	2	0	3	2	3	2	2	2

III CANTIDAD DE PENICILINA: 0.045 µg

Tabla no. 34. Primer día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista					
	13	12	21	03	20	♣
	Grado de inhibición (en +)					
1 SL	3	2	3	3	2	3
2 SL	3	3	3	3	2	3
3 SL	2	3	3	2	2	2
4 SL	3	4	3	2	3	3
5 SL	3	4	3	3	3	3
6 SL	3	4	4	3	3	3

♣ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 35. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista						φ
	13	03	20	06	02		
	Grado de inhibición (en +)						
1 SL	3	3	3	3	3	3	3
2 SL	3	3	2	2	2	2	2
3 SL	3	3	3	3	3	3	3
4 SL	3	3	3	3	3	3	3
5 SL	2	2	2	2	2	2	2
6 SL	3	2	2	2	3	2	2

Tabla no. 36. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista									φ
	13	03	06	02	20	12	17	11	16	
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	3	3	3	3	1	2	2	2	3	3
2 SL	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3
3 SL	3	3	3	3	1	3	4	3	3	3
4 SL	3	2	2	3	1	3	3	2	3	3
5 SL	4	3	3	4	3	3	4	3	4	3
6 SL	4	3	4	4	3	4	4	3	3	4

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la *S. lutea*:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 37. Segundo día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista									
	13	20	12	17	16	08	03	02	11	ϕ
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	1	2	2	0	1	2	2	1	2	2
2 SL	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2
3 SL	2	3	2	2	1	2	3	2	2	2
4 SL	3	3	3	2	2	3	3	2	3	3
5 SL	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3
6 SL	2	3	3	3	2	3	3	2	3	3

IV CANTIDAD DE PENICILINA: 0.060 µg

Tabla no. 38. Primer día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista					
	13	12	21	03	20	ϕ
	Grado de inhibición (en +)					
1 SL	4	4	4	3	3	4
2 SL	4	3	4	3	3	3
3 SL	1	2	2	2	1	2
4 SL	2	3	3	2	2	2
5 SL	4	4	4	2	2	4
6 SL	3	3	4	4	3	3

ϕ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 39. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista						φ
	13	03	20	06	02		
	Grado de inhibición (en +)						
1 SL	3	3	3	3	3	3	3
2 SL	3	3	3	3	3	3	3
3 SL	4	4	3	4	4	4	4
4 SL	4	4	3	4	4	4	4
5 SL	4	4	3	4	4	4	4
6 SL	3	4	3	4	3	3	3

Tabla no. 40. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista									φ
	13	03	06	02	20	12	17	11	16	
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	4	4	4	4	3	4	4	3	4	4
2 SL	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3
3 SL	4	3	3	3	2	3	4	3	3	3
4 SL	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3
5 SL	4	3	3	3	2	3	4	3	3	3
6 SL	4	3	3	3	2	3	3	3	3	3

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la *S. lutea*:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

Tabla no. 41. Segundo día, segundo analista.

Caja petri	Analista									
	13	20	12	17	16	08	03	02	11	φ
	Grado de inhibición (en +)									
1 SL	4	3	3	2	2	3	3	3	3	3
2 SL	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2
3 SL	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2
4 SL	2	2	2	3	1	3	3	2	2	2
5 SL	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
6 SL	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7)

ANEXO NO. 10

TABLAS DE RESULTADOS PARA LA EVALUACION DEL METODO

I CANTIDAD DE PENICILINA: 0.15 µg

Tabla no. 42. Primer día, primer analista.

Caja petri	Analista					
	09	18	01	14	10	φ
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	1	3	1	0	1	1
2 SL	0	0	0	0	0	0
3 SL	0	0	0	0	0	0
4 SL	3	3	3	3	3	3
5 SL	2	3	3	2	2	2
6 SL	0	0	0	0	0	0

Tabla no. 43. Primer día, segundo analista.

Caja petri	Analista					φ
	18	01	07	05	10	
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	4	4	4	4	4	4
2 SL	2	2	1	1	1	1
3 SL	3	2	1	1	1	1
4 SL	2	2	1	1	1	1
5 SL	2	2	1	1	1	1
6 SL	1	1	0	1	0	1

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 44. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista					
	09	18	01	14	10	φ
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	3	4	4	3	3	3
2 SL	0	0	0	0	0	0
3 SL	2	2	2	2	2	2
4 SL	1	1	1	1	1	1
5 SL	3	3	4	2	2	3
6 SL	0	2	2	2	2	2

II CANTIDAD DE PENICILINA: 0.3 µg.

Tabla no. 45. Primer día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista					
	09	18	01	14	10	φ
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	0	0	0	0	0	0
2 SL	2	3	3	2	2	2
3 SL	0	0	0	0	0	0
4 SL	1	1	0	0	1	1
5 SL	0	1	0	0	0	0
6 SL	1	2	1	0	2	2

φ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 46. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	Analista					
	18	01	07	05	10	♠
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	0	0	0	0	0	0
2 SL	4	4	4	4	3	4
3 SL	3	3	2	2	2	2
4 SL	3	2	2	2	2	2
5 SL	0	0	0	0	0	0
6 SL	4	4	4	4	4	4

Tabla no. 47. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Analista					♠
	09	18	01	14	10	
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	2	3	3	3	3	3
2 SL	1	1	1	1	1	1
3 SL	3	4	4	4	4	4
4 SL	3	3	3	3	3	3
5 SL	1	1	1	1	1	1
6 SL	1	1	1	1	1	1

♠ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

III CANTIDAD DE PENICILINA: 0.45  $\mu$ g

Tabla no. 48. Primer día, primer analista.

Caja petri \ Analista	09	18	01	14	10	♠
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	4	4	4	4	4	4
2 SL	4	4	4	3	3	4
3 SL	4	4	4	4	4	4
4 SL	3	4	3	2	2	3
5 SL	3	4	4	3	3	3
6 SL	3	4	3	2	3	3

Tabla no. 49. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	18	01	07	05	10	♠
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	3	2	1	1	1	1
2 SL	4	4	4	4	4	4
3 SL	3	3	3	3	3	3
4 SL	4	4	4	4	4	4
5 SL	4	3	3	3	3	3
6 SL	3	4	3	3	3	3

♠ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 50. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Grado de Inhibición (en +)					
	09	18	01	14	10	♠
1 SL	2	3	3	3	2	3
2 SL	2	2	2	2	2	2
3 SL	4	4	4	4	4	4
4 SL	0	0	0	0	0	0
5 SL	4	4	4	4	4	4
6 SL	3	4	4	4	4	4

IV CANTIDAD DE PENICILINA: 0.6 µg

Tabla no. 51. Primer día, primer analista.

Caja petri \ Analista	Grado de Inhibición (en +)					
	09	18	01	14	10	♠
1 SL	3	4	4	3	3	3
2 SL	4	4	4	4	4	4
3 SL	4	4	4	4	4	4
4 SL	4	4	4	4	4	4
5 SL	3	4	4	3	3	3
6 SL	4	4	4	4	4	4

♠ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 52. Primer día, segundo analista.

Caja petri \ Analista	09	18	01	14	10	ϕ
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	4	4	4	4	3	4
2 SL	4	4	3	3	3	3
3 SL	4	4	3	3	3	3
4 SL	4	4	4	4	4	4
5 SL	3	3	2	2	2	2
6 SL	3	4	3	3	1	3

Tabla no. 53. Segundo día, primer analista.

Caja petri \ Analista	09	18	01	14	10	ϕ
	Grado de Inhibición (en +)					
1 SL	2	3	4	3	3	3
2 SL	3	4	4	4	4	4
3 SL	3	4	4	4	4	4
4 SL	3	3	3	3	3	3
5 SL	3	3	3	3	3	3
6 SL	2	1	2	2	2	2

ϕ = Moda del grado de inhibición.

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) No inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

## ANEXO NO. 11

TABLAS DE RESULTADOS DE LA INFLUENCIA DE LOS DESINFECTANTES  
Y DETERGENTES.

Tabla no. 54. Sanitizante Hipoclorito de sodio al 3 %.

Cajas petri	Analista	17	12	20	03	06	♣
		Grado de inhibición (en +)					
1 SL		0	0	0	0	0	0
1 SLP		0	0	0	0	0	0
2 SL		0	0	0	0	0	0
2 SLP		0	0	0	0	0	0
3 SL		0	0	0	0	0	0
3 SLP		0	0	0	0	0	0
4 SL		0	0	0	0	0	0
4 SLP		0	0	0	0	0	0
5 SL		0	0	0	0	0	0
5 SLP		0	0	0	0	0	0
6 SL		0	0	0	0	0	0
6 SLP		0	0	0	0	0	0

♣ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 55. Sanitizante Germi-gen.

Cajas petri	Analista	17	20	03	06	11	φ
		Grado de inhibición (en +)					
1 SL		0	0	0	0	0	0
1 SLP		0	0	0	0	0	0
2 SL		0	0	0	0	0	0
2 SLP		0	0	0	0	0	0
3 SL		0	0	0	0	0	0
3 SLP		0	0	0	0	0	0
4 SL		0	0	0	0	0	0
4 SLP		0	0	0	0	0	0
5 SL		0	0	0	0	0	0
5 SLP		0	0	0	0	0	0
6 SL		0	0	0	0	0	0
6 SLP		0	0	0	0	0	0

φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 56. Sanitizante Benzal.

Cajas petri	Analista	21	19	03	11	06	φ
		Grado de inhibición (en +)					
1 SL		4	4	4	4	4	4
1 SLP		4	4	4	4	4	4
2 SL		4	4	4	4	4	4
2 SLP		4	4	4	4	4	4
3 SL		4	4	4	4	4	4
3 SLP		4	4	4	4	4	4
4 SL		4	4	4	4	4	4
4 SLP		4	4	4	4	4	4
5 SL		4	4	4	4	4	4
5 SLP		4	4	4	4	4	4
6 SL		4	4	4	4	4	4
6 SLP		4	4	4	4	4	4

φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 57. Sanitizante Sanizol 80 %.

Analista Cajas petri	19	21	07	15	06	◆
	Grado de inhibición (en +)					
1 SL	4	4	4	4	4	4
1 SLP	4	4	4	4	4	4
2 SL	4	4	4	4	4	4
2 SLP	4	4	4	4	4	4
3 SL	4	4	4	4	4	4
3 SLP	4	4	4	4	4	4
4 SL	4	4	4	4	4	4
4 SLP	4	4	4	4	4	4
5 SL	4	4	4	4	4	4
5 SLP	4	4	4	4	4	4
6 SL	4	4	4	4	4	4
6 SLP	4	4	4	4	4	4

◆ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 58. Sanitizante Sanitizer.

Cajas petri	Analista	19	07	03	04	06	φ
		Grado de inhibición (en +)					
1	SL	4	4	4	4	4	4
1	SLP	4	4	4	4	4	4
2	SL	4	4	4	4	4	4
2	SLP	4	4	4	4	4	4
3	SL	4	4	4	4	4	4
3	SLP	4	4	4	4	4	4
4	SL	4	4	4	4	4	4
4	SLP	4	4	4	4	4	4
5	SL	4	4	4	4	4	4
5	SLP	4	4	4	4	4	4
6	SL	4	4	4	4	4	4
6	SLP	4	4	4	4	4	4

φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 59. Sanitizante Sanizol 50 %.

Cajas petri	Analista	19	07	03	04	06	Φ
		Grado de inhibición (en +)					
1 SL		4	4	4	4	4	4
1 SLP		4	4	4	4	4	4
2 SL		4	4	4	4	4	4
2 SLP		4	4	4	4	4	4
3 SL		4	4	4	4	4	4
3 SLP		4	4	4	4	4	4
4 SL		4	4	4	4	4	4
4 SLP		4	4	4	4	4	4
5 SL		4	4	4	4	4	4
5 SLP		4	4	4	4	4	4
6 SL		4	4	4	4	4	4
6 SLP		4	4	4	4	4	4

Φ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

Tabla no. 60. Sanitizante LPH.

Cajas petri	Analista	19	07	03	04	06	ϕ
		Grado de inhibición (en +)					
1 SL		4	3	4	3	3	3
1 SLP		0	0	0	0	3	0
2 SL		3	1	3	4	1	2
2 SLP		4	3	3	3	3	3
3 SL		0	0	0	0	0	0
3 SLP		4	3	2	3	0	3
4 SL		1	0	0	2	0	0
4 SLP		4	4	4	4	4	4
5 SL		2	0	0	1	0	0
5 SLP		0	0	0	0	0	0
6 SL		0	0	0	0	0	0
6 SLP		0	0	0	1	0	0

ϕ = Moda del grado de inhibición

Escala del grado de inhibición del crecimiento de la S. lutea:

- 1) NO inhibición = 0
- 2) Inhibición aproximadamente de 1/4 = 1 +
- 3) Inhibición aproximadamente de 2/4 = 2 +
- 4) Inhibición aproximadamente de 3/4 = 3 +
- 5) Inhibición aproximadamente de 4/4 = 4 +

( Referirse al anexo no. 7 )

## ANEXO NO. 12 CODIFICACION DE ANALISTAS

## C O D I F I C A C I O N

No. Analista		Iniciales
01	=	ACM
02	=	AGH
03	=	APB
04	=	ATN
05	=	BCT
06	=	GHH
07	=	GMA
08	=	ILF
09	=	JTG
10	=	LCL
11	=	LGM
12	=	LLH
13	=	LTL
14	=	MAC
15	=	MCM
16	=	MEL
17	=	MFH
18	=	NSR
19	=	NVG
20	=	RRN
21	=	SRF

ANEXO NO. 13

FORMULACIONES DE LOS DETERGENTES Y DESINFECTANTES

PRODUCTO: PEX BIO-LAB

Sulfonato aniónico.  
Carbonato de sodio.  
Tripolifosfato de sodio.  
Cloruro de sodio.  
Etoxilato.

PRODUCTO: GERMIGEN

Cloro-bromo dimetil glicolil urea  
en solución al 0.15%

PRODUCTO: PRESEPT

Dicloroisocianurato de sodio 5.0 g  
por tableta de 5.0 g (en una base  
efervescente)

PRODUCTO: SANITIZER

Sales cuaternarias de amonio cloradas

PRODUCTO: SANIZOL AL 50 Y 80 %.

Cloruro de dimetil bencil coco amonio.

PRODUCTO: CIDEX

Glutaraldehído al 2.0 %

PRODUCTO: BENZAL

Cloruro de benzalconio al 1.0 %

PRODUCTO: LPH

INGREDIENTES ACTIVOS:  
Acido glicólico ..... 12.6 %  
o-bencil-p-cloro fenol..... 6.1 %  
p-terciario amilfenol..... 3.0 %  
o-fenilfenol..... 0.5 %  
INGREDIENTES INERTES..... 77.8 %

PRODUCTO: HIPOCLORITO DE SODIO AL 3.0 %

TABLAS DE CONTROL DE SIEMBRA DE CEPAS  
 CONTROL DE RESIEMBRA DE CEPAS MICROBIANAS

MICROORGANISMO	CEPA	TINCION	IDENTIFICACION EN MEDIO SELECTIVO	RESIEMBRA EN TUBO INCLINADO
<u>Sarcina lutea</u>	ATCC 9341	cocos G(+) agrupación en cadena	medio no. 1 colonias amarillo limón	medio no. 1 colonias hemis- fericas color amarillo limón

**CONTROL DE AGUA DESTILADA UTILIZADA EN LA PREPARACION  
DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

DETERMINACIONES	ESPECIFICACIONES
Apariencia	Líquido transparente
Color	Incoloro
Cloruros	Máximo 0.5 p.p.m.
Sulfatos	No presenta turbidez
Calcio	No presenta turbidez
Sólidos totales	No más de 1 mg/100 ml.
pH	5.0 - 7.0 a 25°C
Amoniaco	Máximo 0.3 p.p.m.
Conductividad	Máximo 1.5 uohms
Metales pesados	Máximo 0.5 p.p.m.
Sustancias oxidables	El color rosa permanece
Dióxido de carbono	No presenta turbidez

ANEXO NO. 16

TABLA B. LA DISTRIBUCION NORMAL ESTANDAR

(I) Área bajo la curva normal a la derecha de  $z$

**Ejemplo:** La probabilidad de una cola de obtener una  $z$  mayor o igual que 2.18 es 0.0146. Esta es también la probabilidad de una cola de obtener una  $z$  menor o igual que -2.18. Para una probabilidad de dos colas, duplicar el valor tabulado. Por tanto, la probabilidad de obtener una  $z$  mayor o igual que 2.18 o menor o igual que -2.18 es  $2 \times 0.0146 = 0.0292$ .

$z$	.00	.01	.02	.03	.04	.05	.06	.07	.08	.09
.0	.5000	.4740	.4479	.4215	.3950	.3685	.3421	.3157	.2893	.2629
.1	.4602	.4340	.4079	.3815	.3550	.3285	.3021	.2757	.2493	.2229
.2	.4207	.3945	.3683	.3419	.3155	.2890	.2626	.2362	.2098	.1834
.3	.3821	.3559	.3296	.3032	.2768	.2504	.2240	.1976	.1712	.1448
.4	.3446	.3183	.2920	.2656	.2392	.2128	.1864	.1600	.1336	.1072
.5	.3085	.2822	.2559	.2295	.2031	.1767	.1503	.1239	.0975	.0711
.6	.2743	.2480	.2217	.1953	.1689	.1425	.1161	.0897	.0633	.0369
.7	.2420	.2157	.1893	.1629	.1365	.1101	.0837	.0573	.0309	.0045
.8	.2119	.1856	.1592	.1328	.1064	.0800	.0536	.0272	.0008	
.9	.1841	.1578	.1314	.1050	.0786	.0522	.0258	.0000		
1.0	.1587	.1324	.1060	.0796	.0532	.0268	.0000			
1.1	.1357	.1094	.0830	.0566	.0302	.0000				
1.2	.1151	.0888	.0624	.0360	.0096					
1.3	.0968	.0705	.0441	.0177						
1.4	.0808	.0545	.0281	.0017						
1.5	.0668	.0405	.0141							
1.6	.0548	.0285	.0021							
1.7	.0446	.0183	.0019							
1.8	.0359	.0096	.0015							
1.9	.0287	.0061	.0008							
2.0	.0228	.0042	.0003							
2.1	.0179	.0031	.0001							
2.2	.0139	.0024								
2.3	.0107	.0018								
2.4	.0082	.0013								
2.5	.0062	.0009								
2.6	.0047	.0005								
2.7	.0035	.0003								
2.8	.0026	.0002								
2.9	.0019	.0001								
3.0	.0013	.0001								
3.1	.0010	.0000								
3.2	.0007	.0000								
3.3	.0005	.0000								
3.4	.0003	.0000								

(II) Valores críticos de  $z$

**Ejemplos:** Para una prueba de dos colas con  $\alpha = 0.05$ , rechazar la hipótesis nula si  $z$  es mayor o igual que 1.96 o si  $z$  es menor o igual que -1.96.

Para una prueba de una cola con  $\alpha = 0.05$ , si se necesita una prueba de cola superior, rechazar la hipótesis nula si  $z$  es mayor o igual que 1.645. Si se necesita una prueba de cola inferior, rechazarla si  $z$  es menor o igual que -1.645.

$z$	Nivel de significación de una cola, $\alpha$									
	0.1000	0.0500	0.0250	0.0125	0.0100	0.0060	0.0025	0.0010	0.0005	0.0001
	Nivel de significación de dos colas, $\alpha$									
	0.2000	0.1000	0.0500	0.0250	0.0100	0.0050	0.0020	0.0010	0.0002	0.0001
1.282	1.645	1.960	2.241	2.324	2.574	2.807	3.090	3.291	3.719	

## VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Angelocci L. "THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF AMPICILLIN IN BODY FLUIDS" J. Pharm. Pharmac. 23: 471-472 (1971).
- 2.- Alcántara A., Aguilar G, Postilla J. "METODOS ANALITICOS DE VALIDACION". Asociación de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica y Comité de Validación de Métodos Analíticos.
- 3.- Biogo B. Eboli V. "TENTATIVE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETECTION AND QUANTITATIVE ASSEMENT OF AIR CONTAMINATION BY DRUGS" Applied Microbiology 23, 6: 1149-1152 (1972).
- 4.- Brady and Katz "A MICROBIAL ASSAY SYSTEM FOR THE CONFIRMATION OF RESULT OF RECEPTOR ASSAYS FOR ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK" Journal of Food Protection 52: 198-201 (1988).
- 5.- Campbell R. C. "STATISTICS FOR BIOLOGISTS", Cambrigde at the University press, Great Britain (1967).
- 6.- Carlstedt Crespi et al "BIOSYNTHESIS OF DEUTERATED BENZYL PENICILLINS III, RELATIVE ANTIBIOTIC POTENCY OF HIGHLY DEUTERATED BENZYL PENICILLIN" Journal of Pharmaceutical Sciences 62, 5: 856-857 (1973).
- 7.- Carter G. G. "A REVIEW OF PROCEDURES FOR THE DETECTION OF RESIDUAL PENICILLINS IN DRUGS" FDA by line no. 3 (1977).
- 8.- "CODE OF FEDERAL REGULATIONS FOOD AND DRUGS" no. 21, parts 300 to 499 (1987).
- 9.- Connors Kenneth "CHEMICAL STABILITY OF PHARMACUTICAL" Ed. John Willey, USA (1979).
- 10.- Cuevas Pérez Felipe, Cantú Ramírez Rosaura "MEMORIAS DEL CURSO BETA-LACTAMICOS", Asociación Farmacéutica Mexicana, México (1990).
- 11.- Daniel W. Wayne "BIOESTADISTICA BASE PARA EL ANALISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD" Editorial Limusa, México (1990).
- 12.- Dewdney J.M. Edwards R. G. "PENICILLIN HYPERSENSITIVITY IS MILK A SIGNIFICANT HAZARD" Journal of the Royal Society of Medicine 77: 866-877 (1984).
- 13.- Dewdney J. M., Maes L, Raynaud P "RISK ASSESSMENT OF ANTIBIOTIC RESIDUES OF BETA-LACTAMS AND MACROLIDES IN FOOD PRODUCTS WITH REGARD TO THERE IMMUNO-ALLERGIC POTENTIAL" Chem. Tox. 29, 7: 477-483 (1991).

- 14.- Erffmeyer John E. Blaiss M. S. "PROVING PENICILLIN ALLERGY" Postgraduat Medicine 87, 2: 33-41 (1990).
- 15.- Flaum Ira "CONTAMINATION OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS" Journal of Pharmaceutical Sciences 67, 1: 1-11 (1978).
- 16.- Grath, Bryant, Kramer and Kirshbaum "SURVEY OF A LABORATORY BUILDING FOR AIRBORNE ANTIBIOTICS" Journal of Pharmaceutical Sciences 60, 1: 63-67 (1971).
- 17.- Haginaka Jun and Wakai Junko "LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PENICILLINS BY POSTCOLUM DEGRADATION WITH SODIUM HYPOCLORITE" Anal. Chem. 58: 1896-1898 (1986).
- 18.- Hakimipour Fred "PENICILLIN DECONTAMINATION PROCEDURES FOR A PHARMACEUTICAL MANUFACTURIN FACILITY" Pharmaceutical Technology 8, 5: 88 (1984).
- 19.- Kelly Dideberg et al "ON THE ORIGIN OF BACTERIAL RESISTANCE TO PENICILLIN COMPARISON OF A BETA-LACTAMASE AND A PENICILLIN TARGET" Science 231: 1429-1431 (1986).
- 20.- Kirschbawn Joel "ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES" (15) Klaus Florey Editorial, USA (1986)
- 21.- Kucers A. and Benett M. "THE USE OF ANTIIBIOTICS", third edition, William Heinemann Medical Books Ltd, London.
- 22.- Leach Chris, "FUNDAMENTOS DE ESTADISTICA ENFOQUE NO PARAMETRICO PARA CIENCIAS SOCIALES", Editorial Limusa, México (1982).
- 23.- Linares M. E. y Escobedo N. G. "DETERMINACION DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LA PENICILINA G SODICA INYECTABLE Y ESTUDIO DE LA IRRITACION QUE PROVOCA EN EL MUSCULO BUSCANDO UNA FORMULACION ALTERNA INOCUA", tesis para Química Farmacéutica Bióloga, ENEP-Zaragoza, México (1985).
- 24.- Litter Manuel "FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA", 7a. edición, El Ateneo editorial, Buenos Aires Argentina (1986).
- 25.- "THE MERCK INDEX" 10a. edición, USA (1983).
- 26.- Parsons R. L. Beavis J.P. Laurence M. et al "PLASMA, BONE, HIP CAPSULE AND BRAIN FLUID CONCENTRATIONS OF AMPICILLIN AND FLUCLOXACILLIN DURING TOTAL HIP REPLACEMENT AFTER INTRAVENOUS BOOLUS INJECTION OF MAGNAPEN" Clin. Pharmac. 6: 135-143 (1978).
- 27.- Perdue H. S. Gordon J. A. and Mannebach "MICROBIOLOGICAL ASSAY OF ERITHROMYCIN THIOCYANATE IN FEEDS" Journal of the AOAC 52, 4: 672-675 (1969).

- 28.- Richardson Mervyn L. Bowron Judith "THE FATE OF PHARMACEUTICAL CHEMICALS IN THE AQUATICA ENVIRONMENT" J. Pharm. Pharmacol. 37: 1-12 (1985).
- 29.- Saxon Andrew "IMMEDIATE HIPERSENSITIVITY REACTIONS TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS" Infectious diseases 5, 2: 368-369 (1983).
- 30.- "THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP XXII" (1990).
- 31.- Winkler V. W. Nyman M. A. and Benjamin F. "EXTRACTION AND MICROBIOLOGICAL ASSAY OF ERYTHROMYCIN IN FEEDS. I DEVELOPMENT OF THE METHOD" Journal of the AOAC 54, 4: 940-945 (1971).