

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MANAGUA,
NICARAGUA.
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS.
DEPARTAMENTO DE QUIMICA.**

***MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO EN
QUIMICA-FARMACEUTICA***



TITULO: Liofilización de la Cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 utilizada en pruebas de Potencia del Antibiótico Eritromicina CNDR- MINSa Central Managua,

MARZO 2011- MARZO 2012.

Autoras:

Bra. Linda Marina Navarro Cruz.
Bra. Indiana Yovelky Romero Florián.

Tutores:

Lic. María Patricia Baca Solís.
MSc. Martha Xiomara Guerrero.

Asesores:

Dr. Ángel Balmaceda Echeverría.
MSc. María Natalia Gutiérrez Arias.

Managua, Abril 2012.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi amado Dios, único dador de vida y de amor, quien me llevo y me mostro a las personas, lugares y caminos indicados para la culminación de esta soñada meta.

A mis padres, que con esmerada dedicación y apoyo me ayudaron a lo largo de mi vida a alcanzar mis sueños y propósitos.

De manera muy especial a mi adorada y bella madre por su amor incondicional, su entusiasmo y apoyo sin el cual nada de esto sería posible.

A mi hermana, familia y amigos en general por ser siempre solidarios en mis luchas.

Y sobre todo a mi amiga Linda Marina Navarro que con su optimismo y dedicación fue mi guía y mi ejemplo, ya que sin ella este trabajo nunca hubiese sido igual.

Bra. Indiana Yovelky Romero Florián.

Dedico este esfuerzo y sueño hecho por fin realidad en principio a mi Dios, por ser el ser supremo que desde un comienzo me mostro que caminos seguir.

A mi Madre, por su incondicional apoyo, por ser mi ejemplo, mi orgullo, mi motivo. A mi Padre, por sus consejos y ejemplo de fe. A mi abuela y hermana, por ser mi pequeña gran familia durante todo este tiempo. A mi novio, por apoyarme y escucharme en cada momento que lo necesite, a pesar de no entender lo que hacía.

A mi compañera de luchas, fracasos y triunfos, por ser quien soñaba conmigo cada día de esta travesía, y por ser mí soporte cada que pensaba en desfallecer, muchas gracias Indy.

Espero con toda sinceridad que este trabajo que con mucho empeño y esfuerzo hemos realizado, sea pie para nuevos grandes proyectos que alimenten y fortalezcan la visión científica de todos los profesionales en Nicaragua en especial los nuevos y futuros colegas, que sea de gran ayuda para mejorar la calidad de vida de las personas, en cuanto a la terapéutica farmacológica concierne.

Bra. Linda Marina Navarro Cruz.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer en primer lugar a Dios por darnos la oportunidad de vivir y culminar exitosamente nuestros estudios, a nuestros Padres que con su cariño y apoyo hicieron este sueño posible. A nuestros Maestros quienes a lo largo del ciclo de estudio nos brindaron sus conocimientos de una forma eficiente.

De forma muy fraterna nuestro agradecimiento a nuestras magnificas tutoras: Lic. María Patricia Baca quien con su apoyo y guía contribuyo de una forma especial en la realización de dicha investigación, ya que con su experiencia, ejemplo y dedicación compartió sus conocimientos. Y a la MSc. Martha Xiomara Guerrero que con sus aportes nos brindo las herramientas necesarias para ser capaces de elaborar un documento con las exigencias requeridas.

A nuestros Asesores: Dr. Ángel Balmaceda Echeverría por su confianza, apoyo y seguridad hacia este proyecto, a la MSc. María Nathalia Gutiérrez por su disposición ya que por sus oportunas sugerencias hicieron posible la culminación de este trabajo.

Y todas aquellas personas que nos han dado ánimo y que de una u otra manera colaboraron a lo largo del desarrollo y realización de este proyecto. Entre ellas, el personal de profesionales del departamento de Virología, CNDR- Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, por abrirnos sus puertas desinteresadamente, Licenciados del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos; su Directora Lic. Nubia Blanco, por ser quien nos abrió paso para iniciar lo que hoy concluimos; a todos por su paciencia y esmero al mostrarnos como hacer bien las cosas.

Br. Indiana Yovelky Romero Florián

Br. Linda Marina Navarro Cruz.

RESUMEN

El presente estudio de carácter descriptivo, con corte transversal no experimental se baso en demostrar el éxito de la Técnica de conservación microbiológica Liofilización, aplicada a la cepa bacteriana *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 mejor conocida como *Micrococcus luteus*, utilizada en el Control de calidad microbiológico del antibiótico Eritromicina. El ensayo se llevo a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Diagnostico y Referencia del MINSA Central, en las direcciones de Virología y del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (LNCCM).

La investigación se realizó bajo la Guía del Protocolo: “*Red internacional de laboratorios de Microbiología: Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública del mundo en desarrollo, publicado en el año 2004*”, en el que se establecen determinados parámetros, los que fueron evaluados como objetivos principales a lo largo de la investigación, tales son: **Viabilidad, Pureza y Estabilidad** de los liofilizados con el fin de garantizar su eficacia y seguridad.

Dichos parámetros fueron probados en 10 lotes de liofilizados de la cepa ATCC 9341, cumpliendo cada uno de ellos con resultados excelentes como: Crecimiento 4/4 cuadrantes, con coloración amarillo intenso, características morfológicas típicas de Cocos Gram+, agrupados en paquetes y con 7 días de estabilidad acelerada. Además se realizaron pruebas de obtención de Halos de Potencia antimicrobiana, cuyos resultados refuerzan la investigación.

A partir de los resultados obtenidos, se comprobó que la Técnica de Liofilización conserva la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 en condiciones puras, viables y estables para ser utilizada en pruebas de potencia de Eritromicina en la Industria Farmacéutica, garantizando así la reproducibilidad de esta en futuras investigaciones.

Se recomienda continuar realizando estudios referentes a esta Técnica para que se logre así la implementación de la misma en el País a través de la construcción de un Cepario Nacional.

INDICE

INDICE

Pág.

Capítulo I

GENERALIDADES:

1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Planteamiento del Problema	3
1.4 Justificación	4

Capítulo II

2. MARCO DE REFERENCIA	5
2.1 Métodos de Conservación	5
2.2 Liofilización	6
2.2.1 Concepto	6
2.2.2 Etapas de la Liofilización	7
2.2.3 Condiciones previas a la exposición	8
2.2.4 Medio de Leche Descremada	9
2.2.5 Procedimiento para almacenar Cepas	10
2.3 Procedimiento de Liofilización según Protocolo	10
2.3.1 Recuperación del Liofilizado	11
2.3.2 Control de esterilidad y viabilidad de cepas	11
2.3.3 Estabilidad de los Liofilizados	11
2.3.3.1 Procedimientos de la prueba de Estabilidad Acelerada	12
2.3.3.2 Condiciones para la Estabilidad Acelerada	12
2.3.4 Ventajas de la Técnica de Liofilización	14
2.3.5 Desventajas de la Técnica de Liofilización	14
2.4 Microorganismo	15
2.4.1 Concepto	15
2.4.2 Los Microorganismos en la Industria Farmacéutica	15
2.5 Bacteria	17
2.5.1 Identificación Bacteriana: Tinción de Gram	17

2.6 Cepas Bacterianas	18
2.6.1 Concepto	18
2.6.2 Agrupaciones	19
2.7 Ceba <u><i>Kocuria rhizophilia</i></u>	21
2.7.1 Eritromicina	22
2.8 Potencia Antimicrobiana	23
2.8.1 Obtención Halos de Inhibición	23
2.8.1.1 Diluyentes	23
2.8.1.2 Soluciones Amortiguadoras de fosfato y otras	23
2.8.1.3 Preparación	23
2.8.1.3.1 Preparación del estándar	23
2.8.1.3.2 Preparación del inóculo bacteriano	24
2.8.1.3.3 Preparación Capa Base y Capa Siembra	24
2.13 Verificación de pruebas básicas de control de calidad de Medios	25

Capítulo III

3. Hipótesis	27
--------------	----

Capítulo IV

4. DISEÑO METODOLOGICO	28
4.1 Descripción del ámbito de estudio	28
4.2 Tipo de estudio	28
4.3 Universo de Estudio	28
4.4 Variables de estudio	28
4.4.1 Variables Independientes de estudio	28
4.4.2 Variables Dependientes de estudio	28
4.5 Materiales	29
4.6 Equipos	29
4.7 Medios de Cultivos y reactivos	30
4.8 Reactivos Tinción de Gram	30
4.9 Instrumentos para recolectar información	30
4.10 Materiales para procesar información	31
4.11 Operacionalización de Variables	32
4.12 Protocolo de Referencia	34
4.13 Procedimientos	38
4.13.1 Concentración Inóculo y Tiempo Liofilización	38

4.13.2 Pruebas de Control de Calidad de Medios de Cultivos	41
4.13.3 Pureza y Viabilidad de Cepa Control y Liofilizados	43
4.13.4 Estabilidad Acelerada de Liofilizados	45
4.13.5 Obtención de Halos de Potencia	46
Capítulo V	
5. Resultados	51
5.1 Concentración Inoculo y Tiempo de Liofilización	51
5.2 Verificación de pruebas básicas de medios	52
5.3 Pureza y Viabilidad	53
5.4 Estabilidad Acelerada	55
5.5 Obtención de Halos	56
Capítulo VI	
6. Conclusiones	57
Capítulo VII	
7. Recomendaciones	58
BIBLIOGRAFIA	59

ANEXOS

GLOSARIO

INTRODUCCION

La liofilización se basa esencialmente en el principio de paralización del metabolismo celular bacteriano por falta de agua a través de los procesos de congelación y sublimación. A lo largo de la investigación se utilizaron diferentes materiales y equipos, evaluando distintos parámetros que garantizaron la efectividad de la técnica de Liofilización.

El estudio, radico por lo tanto en llevar a cabo el ensayo de una de las técnicas de conservación más fiables, aplicada a la cepa bacteriana *Kocuria rhizophilia ATCC 9341* o mejor conocida como *Micrococcus luteus*, a fin de comprobar y demostrar que con el uso de esta técnica se conserva la cepa en estado puro, viable y estable, resultados que fueron excelentes a lo largo del presente ensayo.

A nivel de Industrias Farmacéuticas, existen áreas indispensables para el aseguramiento de la calidad de las drogas, como el control microbiológico donde se practican pruebas como la Potencia de antibióticos, para estos fármacos la ciencia debe auxiliarse de las mismas bacterias para realizar dichos análisis, requisitos que dependen muchas veces de la calidad de conservación de las cepas bacterianas.

Es importante resaltar el hecho de que en Nicaragua, actualmente no se registran estudios similares que sirvan como antecedentes a la Liofilización bacteriana por lo que el cumplimiento de los objetivos de la investigación, estuvieron sujetos estrictamente a la guía del protocolo de referencia, la cual ya ha sido estudiada, aprobada y estandarizada internacionalmente por Colombia, y es actualmente valida y utilizada por la “*Red internacional de laboratorios de Microbiología bajo el manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública del mundo en desarrollo, publicado en el año 2004*”.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Realizar el ensayo de liofilización de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 para pruebas de potencia del antibiótico Eritromicina en las Instalaciones del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios (MINSAs central), en el período de Marzo 2011 a Marzo 2012.

Objetivos específicos:

1. Ensayar de la técnica de Liofilización a fin de establecer concentración del inóculo bacteriano: *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 a liofilizar, y tiempo de liofilización.
2. Aplicar pruebas de control de calidad a los medios de cultivo utilizados para la recuperación de la bacteria *Kocuria rhizophilia* ATCC y Liofilizada.
3. Estimar la pureza y viabilidad de la cepa control *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 en comparación con los Liofilizados.
4. Verificar la estabilidad acelerada de los liofilizados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el desarrollo de la microbiología como ciencia que estudia los seres a niveles microscópicos, se ha demostrado que los microorganismos que anteriormente eran los causales de las patologías, hoy en día pueden ser remedio para estas, además de funcionar como agentes de prueba para los medicamentos obtenidos.

Los microorganismos empleados para experimentos, análisis industriales de control, etc., en todos los niveles de estudio, se presentan o comercializan en cepas de bacterias, que son asociaciones de colonias bacterianas de una misma especie, cuyas características son bien conocidas y de cuyo nivel patógeno se ha prescindido para tal fin. Dichas cepas deben contar con una técnica adecuada que garantice su preservación en estado puro, viable y estable como principales condiciones.

Actualmente en el país, se hacen uso de métodos de preservación o conservación de cepas a corto plazo, que debido a varios factores no aseguran en su totalidad la calidad de la conservación en sí, además de causar por momentos la carencia de dichos reactivos estándares biológicos (Cepas) al tener que esperar que estos provengan del extranjero para poder trabajar.

Para dar respuesta a este problema, existen métodos de conservación de cepas a largo plazo, los que son precisos, de calidad y alta seguridad, tal es el caso de la Liofilización. Esta es una técnica muy recomendable por su comodidad para la preservación, el almacenamiento y transporte de la cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C-20°C), con lo cual su envío es muy cómodo.

Aunque en el país los avances de esta técnica no se encuentran muy afianzados, cabe destacar que se cuenta con uno de los pilares fundamentales que permitió el comienzo de la experimentación de la Técnica, el equipo Liofilizador (Dpto. Virología MINSÁ-CNDR).

JUSTIFICACIÓN

La liofilización es una de las técnicas que permite conservar la calidad microbiológica (proporciona productos con una estabilidad óptima, una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación a largo plazo; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso), de modo que asegura el éxito de los análisis en los que los microorganismos son empleados. Un ejemplo de esto, son los análisis obligatorios de potencia antibacteriana realizados a los antibióticos en las industrias farmacéuticas.

En cuanto a esta técnica en particular, tomando en cuenta ventajas, desventajas, y la real necesidad de encontrar solución a problemas como el antes mencionado, para el avance tecnológico industrial, en el país, se evaluó el éxito de esta para preservar la cepa ATCC 9341 “*Kocuria rhizophilia*”, con la primordial ventaja de contar con los equipos necesarios para dicho fin, en especial, con el equipo liofilizador, localizado en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios (MINSA Central).

El éxito de la aplicación de esta técnica de conservación microbiológica, es de gran importancia para el desarrollo científico del país, ya que permite disponer de cepas confiables inmediatamente para su uso. Además, la cepa “*Kocuria rhizophilia*” liofilizada, constituye el primer paso para la estructuración de un Cepario propio para uso del futuro Instituto de Investigación, en el Complejo de Salud antes mencionado.

Por consecuente, dicho logro representa el inicio para posteriores estudios en el área de control microbiológico de productos sanitarios, farmacéuticos y una gran gama de productos de uso industrial, cuyos beneficiarios comprende desde las Industrias Farmacéuticas, Laboratorios Clínicos, Laboratorios de Universidades y toda Institución que tenga interés en el tema hasta los consumidores como tales.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Métodos de Conservación de Cepas Bacterianas

El objetivo principal de la preservación o conservación de cepas o aislamientos de microorganismos es el de mantenerlos puros, viables, sin variaciones ni mutaciones, que se asemejen en lo posible al aislamiento inicial.

Muchos métodos han sido usados para preservar las bacterias, pero no todos los géneros se comportan en forma similar cuando son sometidos al mismo proceso, inclusive, en ocasiones, cepas de la misma especie pueden responder en forma diferente.¹

Los métodos de conservación de las cepas estándar de control de calidad, deben asegurar que las mismas mantengan sus características típicas y que puedan ser reproducidas después. El medio utilizado para su conservación debe mantener un mínimo de mutaciones, las que pueden evitarse permitiendo el mínimo crecimiento del microorganismo y aportando óptimas condiciones ambientales para su sobrevivencia, con el menor número de subcultivos.

Estas mutaciones pueden evitarse permitiendo también el mínimo crecimiento del microorganismo y aportando óptimas condiciones ambientales para su sobrevivencia, con el menor número de Subcultivos.

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- a) Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- b) Preservar los niveles de su productividad inicial.
- c) Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad.

1. (Instituto nacional de salud- Red Nacional de laboratorios: Manual para la vigilancia de *S. Pneumoniae* y *H. Influenzae*, versión N° 4, página 156)

2.2 LIOFILIZACIÓN

2.2.1 Concepto

La liofilización está considerada como la técnica más adecuada para la preservación de microorganismos, involucra en resumen el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo que resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio.

La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células con un medio crio protector, del cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada a aproximadamente -40 °C y deshidratada mediante una sublimación en vacío.

El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad, de allí la importancia de mantener el vacío.

El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%, suero equino, mezclas de suero, glucosa y extracto de levadura, suero fetal bovino, etc.

En algunos casos el efecto protector de la leche descremada es mejorado por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea. La sacarosa se ha empleado para reemplazar la leche descremada, y para mejorar su performance se le adiciona glutamato de sodio y bactocastone u otro componente nitrogenado.

Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunos casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido.

En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células, de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta.

Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%.

2.2.2 Etapas de la liofilización (Anexo No.1)

La Técnica es llevada a cabo a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica para evitar la formación de coágulos de agua.

Congelación inicial: Es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto. En líneas generales podemos decir que una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación.

Sublimación o desecación primaria: Es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

Deserción o desecación secundaria: Su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 %.

2.2.3 Condiciones previas a la exposición a bajas temperaturas

Las condiciones previas que ha de tenerse en cuenta a la exposición de bajas temperaturas de las cepas son:

La edad del cultivo

Los cultivos muy jóvenes o muy viejos muestran menor resistencia al shock térmico. La edad idónea corresponde con el fin de la etapa logarítmica, siendo el principio de la fase estacionaria la de mayor probabilidad de recuperación, siendo el de los microorganismos en general de 24 horas de incubación a 37° C.

Preparación de las cepas bacterianas

El crecimiento y la preparación del microorganismo determinan el estado fisiológico de las células, el cual tiene influencia directa en el resultado de los ensayos.²

2. (Asociación Española de la Industria A.E.F.I: Validación de Métodos Analíticos pág. 143)

Medio de soporte- Crio protector

Se utiliza para proteger el tejido biológico de la congelación (daño debido a la formación de hielo). En general, todos los aislamientos bacterianos se pueden liofilizar utilizando como medio de soporte la leche descremada al 20 %. Existen algunas excepciones como son especies de los géneros: *Campylobacter*, *Helicobacter* sp y *Neisseria gonorrhoeae*, que no resisten la liofilización.

2.2.4 Medio de leche descremada

La leche descremada se usa como un medio completo, o como ingrediente de otro medio especial, para la propagación de microorganismos en productos lácteos. El polvo de leche descremada, es un polvo desecado a partir de grandes volúmenes de leche descremada, es soluble y fácil de preparar. La leche descremada al 20 % es usada como crio protector para conservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos a -70°C así como para el proceso de liofilización de la mayoría de los microorganismos incluyendo levaduras y hongos.

Composición química

Bacto-skimmilk Difco 0032, es un producto estandarizado, recomendado como medio de cultivo que cuando se reconstituye equivale a la leche descremada fresca.

Preparación (Anexo No. 2)

1. Disolver 20 gramos del medio deshidratado en 100 ml de agua destilada o desionizada.
2. Distribuir 10 ml en tubos de tapa de rosca de 150/15mm.
3. Esterilizar a 116°C por 10 minutos.

Se requiere especial cuidado de evitar sobre calentamiento o que la leche tome un color caramelo, ya que de esta manera no conservaran los microorganismos. La duración del medio preparado es de dos meses, y el pH del medio debe mantenerse a 6.1 +/- 0.2.

2.2.5 Procedimiento para almacenar las cepas (Anexo No. 3)

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II.

1. Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 hrs en un medio no selectivo.
2. Dispensar de 1 a 1.5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crio viales) de 2 ml.
3. Hacer una suspensión densa del microorganismo.
4. Rotular los viales con los códigos correspondientes de las o la cepa y la fecha de recolección. La rotulación debe realizarse con una tinta que resiste bajas temperaturas y los viales se deben almacenar en cajas especiales, debidamente marcadas.
5. Colocar los viales en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.

2.3 Procedimiento de Liofilización según Protocolo de Referencia

1. Obtener un cultivo puro de 18-24 hrs, en un medio enriquecido, no selectivo (sin antibióticos o sustancias inhibitorias), del microorganismo que se va a liofilizar.
2. Realizar una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 ml de leche descremada estéril al 20%.
3. Colocar la suspensión en el vial o ampolleta apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice. (Los viales deben ir debidamente marcados de acuerdo con el sistema de identificación que el laboratorio utilice).
4. Congelar la suspensión a -70°C .
5. Liofilizar los aislamientos (el tiempo de liofilización va a estar en dependencia del equipo que se vaya a utilizar).

2.3.1 Recuperación del liofilizado (*Anexo No.4*)

1. Desinfectar el tapón del vial con una gasa impregnada de alcohol y flamear. Rehidratar el liofilizado del cultivo con 1 ml de caldo nutritivo estéril.
2. Haciendo uso de una jeringa, resuspender y con la misma jeringa retirar la suspensión del vial.
3. Sembrar la suspensión en un caldo nutritivo y en medios sólidos de acuerdo con el microorganismo que se va a recuperar. Este procedimiento se hace para la reconstitución general de todo liofilizado bacteriano.

2.3.2 Control de esterilidad y viabilidad de cepas

El control de esterilidad debe realizarse antes y después de la liofilización para poder determinar la efectividad del proceso. También debe hacerse un control periódico para determinar el tiempo de viabilidad de cada microorganismo.

Para realizar el control de viabilidad y esterilidad de las cepas liofilizadas, debe emplearse el 10 % de los viales, reconstituir con 1 ml de caldo nutritivo estéril, sembrar en el medio adecuado e incubar por 18 horas. Se considera buen crecimiento, cuando la cepa crece en dos de los cuatro cuadrantes del medio (*Anexo No. 11*)

2.3.3 Estabilidad Acelerada de Liofilizados

También conocida como Estabilidad Normal o Exploratoria tiene como objetivo proporcionar datos para prever la estabilidad del producto, tiempo de vida útil y compatibilidad de la formulación con el material de acondicionamiento.

Esta prueba es empleada también en la fase de desarrollo del producto utilizándose lotes producidos en escala laboratorio y piloto de fabricación, pudiéndose extender a las primeras producciones. Sirve como auxiliar para la determinación de la estabilidad de la formulación. Es un estudio predictivo que puede ser empleado para estimar el plazo de validez del producto.

Además, puede ser realizado cuando existan cambios significativos en ingredientes del producto o del proceso de fabricación, en material de acondicionamiento que entra en contacto con el producto o para validar nuevos equipamientos o fabricación por terceros.

2.3.3.1 Procedimiento de la prueba de estabilidad acelerada (*Anexo No. 5*)

Los valores generalmente adoptados para temperaturas elevadas son:

Estufa: $T = 37 \pm 20$ °C

Estufa: $T = 40 \pm 20$ °C

Estufa: $T = 45 \pm 20$ °C

Estufa: $T = 121 \pm 20$ °C

Los valores generalmente adoptados para bajas temperaturas pueden ser:

Congelador: $T = -5 \pm 20$ °C, o $T = -10 \pm 20$ °C

2.3.3.2 Condiciones para Estabilidad Acelerada

Las muestras también deben ser sometidas a la Prueba de Estabilidad Acelerada en su material de acondicionamiento,

Los productos deben ser almacenados en más de una condición de temperatura, para que se pueda evaluar su comportamiento en los diversos ambientes a los que pueda ser sometido.

La periodicidad de la evaluación de las muestras puede variar conforme la experiencia técnica, especificaciones del producto, características especiales de algún componente de la formulación o sistema conservante utilizado, sin embargo lo más usual en este estudio acelerado es que sean evaluadas inicialmente en tiempo cero, 24 horas y a los 7, 15, 30, 60 y 90 días.

Los parámetros a ser evaluados dependen de las características de la formulación en estudio y de los componentes utilizados en esta formulación. De manera general, se evalúan:

Características organolépticas: aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable

Características microbiológicas: estudio del sistema conservante del producto por medio de la prueba de desafío efectuada antes y/o después del período de estudio acelerado

Las muestras son evaluadas en comparación a la muestra-patrón y productos considerados “referencia”, sometidos a las mismas condiciones de la prueba. Generalmente se definen límites de aceptación para los parámetros evaluados, y la muestra-patrón deberá permanecer inalterada durante toda la vida útil del producto.

La correspondencia entre los datos y su interpretación debe ser relativa por considerar que, en la práctica, los objetivos y las características de cada producto o categoría son muy distintos. En general, se consideran los siguientes criterios:

Aspecto

El producto debe mantenerse íntegro durante toda la prueba, manteniendo su aspecto inicial en todas las condiciones, excepto en temperaturas elevadas, congelador o ciclos en los que pequeñas alteraciones son aceptables.

Compatibilidad con el material de acondicionamiento

Se debe considerar la integridad del embalaje y de la formulación, evaluándose la funcionalidad. En los casos en que el monitoreo de los contenidos de ingredientes activos es necesario, se debe tomar en consideración los parámetros de calidad y performance del producto. Otros parámetros pueden ser establecidos de acuerdo con el formulador y las especificaciones del producto.

2.3.4 Ventajas de la técnica de liofilización

1. La temperatura a la que es sometida el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
2. Debido a la baja temperatura que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles, es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
3. La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado.
4. Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad.

Todas estas particularidades pueden resumirse en: una estabilidad óptima, una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso.

Su reducido peso y volumen, la facilidad de incorporar vitaminas y oligoelementos y la capacidad de almacenaje bajo cualquier situación por periodos de incluso hasta más de 5 años, son sus principales características.

2.3.5 Desventajas de la liofilización

1. Es un proceso costoso.
2. Necesidad de personal calificado en la operación y mantenimiento de los equipos.
3. Elevado costo de inversión de las instalaciones y equipos.

2.4 MICROORGANISMO

2.4.1 Concepto

Un microorganismo, también llamado microbio, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares.

Según el autor, Detlev Ganten en su libro *todo naturaleza*, maneja que "los microorganismos son también el destilado de la vida y que hay dos cosas que dominan a la perfección, y éstas dos cosas son precisamente las que definen la vida. La primera, los microorganismos son la encarnación del metabolismo y de la reproducción. La segunda, son la versión básica de la vida, y a la vez son la base irrenunciable de toda la vida en la tierra".

2.4.2 Los Microorganismos en la Industria Farmacéutica

El desarrollo de la importancia del papel de los microorganismos en la industria y principalmente en la industria farmacéutica dio inicio a partir del importante suceso como lo fue la producción de penicilina a partir del hongo *Penicillium*. Hoy en día, la biotecnología es la principal herramienta para la obtención de nuevos antibióticos que sean activos frente a las bacterias patógenas resistentes. También resulta de gran utilidad la aplicación de la ingeniería genética en microorganismos para sintetizar antibióticos sintéticos, es decir, ligeramente diferentes de aquellos obtenidos de forma natural.

Conjuntamente han llegado a "programar" bacterias con objeto de obtener distintos tipos de drogas que, de otra forma, no podrían fabricar. La insulina humana, necesaria para el tratamiento de la diabetes, es un claro ejemplo de esta metodología, ya que está producida por bacterias en las que se ha introducido, mediante ingeniería genética, el gen que codifica la síntesis de esta hormona.

Igualmente, la hormona del crecimiento humano, utilizada para el tratamiento de niños con deficiencias en su producción, y que de otro modo no podrían alcanzar una estatura normal.

En cuanto a los medicamentos obtenidos a partir de microorganismos (Bacterias) se encuentran principalmente los antibióticos que son sustancias que difunden en el medio donde viven impidiendo el crecimiento de otros microorganismos o bien causando su muerte.

Antibióticos más conocidos en la actualidad (se diferencian en la estructura química):

- *Antibióticos Beta lactámicos*: Penicilinas y Cefalosporinas.
- *Amino glucósidos*: Estreptomina.
- *Macrólidos*: Eritromicina.
- *Tetraciclinas*: Antibióticos de amplio espectro.

Sin embargo, cabe mencionar, que el papel de los microorganismos, no solo está en el proceso de producción de las diversas formas farmacéuticas recién mencionadas, sino que trasciende hasta el momento de las pruebas finales que se les realiza a dichos preparados, de modo de garantizar la eficacia y seguridad de los fármacos (antibióticos específicamente), en terapéutica.

La principal o más importante prueba realizada a antibióticos en la industria es la de potencia antimicrobiana, para la cual se necesita contar con cepas microbianas específicas para cada grupo de antibióticos, que aseguren ser puras, estériles y por supuesto que estén en condiciones vitales para tal fin.

2.5 BACTERIA

La bacteria es un microorganismo de una sola célula, pertenecen al reino mónera, sus formas pueden ser esférica, espiral, etc. Pueden existir como organismos individuales, formando cadenas, grupos, pares o tríos.

Las bacterias son una de las formas de vida más abundantes en la tierra. Tienen una longitud entre 0,4 y 14 μm y sobre 0,2 a 12 μm de ancho. Consecuentemente sólo se pueden ver mediante microscopio. Se reproducen mediante la multiplicación del ADN, y división en dos células independientes.³

Algunas bacterias pueden formar esporas. Estas esporas se caracterizan por presentar una capa protectora resistente al calor y que protege la bacteria de la falta de humedad y comida. Tienen un papel funcional ecológico específico. Por ejemplo, algunas realizan la degradación de la materia orgánica, otras integran su metabolismo con el de los seres humanos, si bien algunas de ellas son patógenas (causantes de diversas enfermedades), una gran parte de ellas son inocuas o incluso buenas para la salud.

2.5.1 Identificación bacteriana: Tinción de Gram (*Anexo No. 6*)

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

3. (AOAC (1995). In US FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th edn, pp. 20.01–20.04 Cap. *Morfología Bacteriana* pág. 235).

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

- El cristal violeta (colorante catiónico), penetra en todas las células de las bacterias, tanto en Gram positivas como Gram negativas.
- El lugol está formado por I_2 en equilibrio con KI, el cual está presente para solubilizar el Yodo, este entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.
- La mezcla de alcohol-cetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2 /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos si lo hacen.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas, utilizan una coloración de contraste. Habitualmente es una coloración roja, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen azules. La safranina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica.

2.6 CEPAS BACTERIANAS

2.6.1 Concepto

En microbiología, es una variante fenotípica de una especie o incluso de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias. De una manera más básica puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

Existen sociedades científicas, las colecciones de cultivos tipo, que almacenan una gran diversidad de microorganismos y que los difunden a petición de los investigadores; en dichas colecciones, la atribución taxonómica de cada clon está perfectamente asegurada hasta el nivel de cepa.

Según la "ISO 11133-1:2000", (*Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivos. Parte 1: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de cultivo en el laboratorio*) las normas a tomar en cuenta para definir una cepa referencia son:

- A. Que sean microorganismos definidos, por lo menos a nivel de género y especie.
- B. Que se encuentren debidamente catalogados.
- C. Con características y origen conocido.

2.6.2 Agrupaciones:

Las cepas se pueden agrupar según sus características comunes:

- **Biovar** o biotipo, que son aquellas cepas que tienen características bioquímicas y fisiológicas especiales.
- **Morfovar** o morfo tipo, con morfología específica.
- **Serovar** o serotipo, con características antigénicas específicas.
- **Patovar** o pato tipo, con propiedades patógenas para ciertos hospedadores.
- **Fagovar** o fago tipo, con especificidad para lisar ciertos bacteriófagos.

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad. Algunos ejemplos son:

ATCC: American Type Culture Collection- Rockville, USA.

NCIC: National Collection of Industrial Bacteria- Surrey, Inglaterra

JFCC: Japanese Federation of Culture Collection of Microorganism- Japan

CCTM: Colección Nacional – Lille, Francia

RIA: USSR Reseach Institute for Antibiotics- Moscú, Rusia.

NCIB: Colección Nacional industrial – Aberdeen, Escocia

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen – Gottinger, Alemania.

Generalmente, para análisis o pruebas microbiológicas, se utilizan cepas de referencia como las ATCC (*Anexo No. 7*) y si son cepas domésticas, es necesario tener un historial del organismo que incluye nombre, área de aislamiento, reacciones bioquímicas y patrón de sensibilidad a los antibióticos, forma de almacenaje, fecha de último trasplante, etc.

La ATCC Bacteriología Collection es el conjunto más diverso de procariotas en el mundo, con más de 18.000 cepas de más de 750 géneros. Cada grupo fisiológico importante procariotas está representado. La colección cuenta con más de 3.600 culturas tipo de especies válidamente descritas, constituyen la base de la bacteriología sistemática, y cerca de 500 bacteriófagos.

En todo caso, las cepas de referencia deben tener requisitos específicos:

- Características típicas.
- Características estables.
- Reproducibilidad

Uso de cepas en la industria farmacéutica:

- ➔ Para Pruebas industriales de potencia antimicrobiana de los diferentes antibióticos fabricados.
- ➔ Para Pruebas microbiológicas: Límite microbiano.
- ➔ Para promoción de crecimiento bacteriano en Microbiología.
- ➔ Para Estudios Clínicos en Medicamentos.
- ➔ Para Investigaciones clínicas y microbiológicas en Universidades.

2.7 CEPA *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.

Es una bacteria Gram-positiva, con forma esférica, de diámetro comprendido entre 0,5 y 3 micrómetros que típicamente aparecen en tétradas. Pertenece a la familia Micrococcaceae que tienen una gruesa pared celular que puede abarcar tanto como el 50% del material celular. Su genoma es rico en guanina y citosina (GC), típicamente en porcentaje del 65 al 75% de contenido GC. A menudo contienen plásmidos (de tamaño comprendido entre 1 y 100MDa) que proporcionan al organismo características útiles.

Se encuentra en el suelo, polvo, agua y aire, y como parte de la flora normal de los mamíferos en la piel. La bacteria también coloniza la boca humana, las mucosas, oro faringe y tracto respiratorio superior, transformando el sudor en compuestos de olor desagradable. Es resistente a la reducción potencial de agua y pueden tolerar la desecación y las altas concentraciones de sal.⁴

Es coagulasa negativo, forma colonias de color amarillo brillante en agar nutriente. Se ha detectado que sobre producen riboflavina cuando crecen sobre medios orgánicos tóxicos tales como piridina.

Pueden sobrevivir durante largos periodos: cultivos no protegidos en muestras de suelo han revivido después de estar almacenados en un refrigerador durante 10 años.

La ATCC 9341 fue depositada como *Sarcina lutea* por los EE.UU. (Food and Drug Administration) por más de 40 años. Aunque el nombre fue cambiado a *M. luteus* en 1977⁵. Se comprobó por secuenciación genotípica que sus características no son idénticas a las de las típicas *M. cepas luteus*. Por lo tanto, se reclasifico la ATCC 9341 como *Kocuria rhizophilia*.

4. *Genus I. Micrococcus Cohn 1872, 151.* (Baird-Parker, 1974 Pág. 367)

5. *Manual Bergey de Bacteriología determinante* (Baird-Parker, 1974)

Es conocida también como *Micrococcus lysodeikticus*, *luteus*, *flavus*, *Sarcina aurantica*, *citrea*, *flava*, *lutea*, *Marganata*, *subflava*, *variabilis*.

La ATCC 9341, cumple con una función de gran importancia en la farmacología de los medicamentos al igual que muchas otras bacterias, esta en particular, funciona como organismo de prueba con el que se mide la potencia antimicrobiana del antibiótico Eritromicina.⁶



Figura 2.7.1. M. Luteus.
Fuente: rci.rutgers.edu



Figura 2.7.2 M. Luteus en Agar Sangre
Fuente: microbiologyatlas.kvl.dk

2.7.1 Eritromicina

La Eritromicina es un antibiótico usado para tratar ciertas infecciones causadas por las bacterias, como bronquitis, difteria, enfermedad de los legionarios, tos ferina, neumonía, fiebre reumática, enfermedades venéreas y las infecciones del oído, el intestino, el pulmón, las vías urinarias y la piel. También se usa antes de algunos tipos de cirugía o trabajo dental para prevenir infecciones. Los antibióticos no tienen ningún efecto sobre los resfriados, la gripe u otras infecciones víricas.⁷

6. Jawetz, Melnick y Adelberg. "Microbiología Medica". 17va Edición. Manual Moderno. 2002. Pág. 662)

7. (British Pharmacopoeia Commission (1993). Biological assay of antibiotics. Pág. 123).

2.8 POTENCIA ANTIMICROBIANA

2.8.1 Obtención de Halos de Inhibición

2.8.1.1 Diluyentes

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

2.8.1.2 Soluciones amortiguadoras de fosfato y otras soluciones

Se debe preparar las soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio requeridas para el antibiótico en análisis. Las soluciones amortiguadoras se esterilizan después de su preparación y el pH especificado en cada caso corresponde al pH después de la esterilización.

2.8.1.3 Preparación (Anexo No. 8)

Una de las formas para demostrar la efectividad de las cepas bacterianas en análisis microbiológicos, es mediante la obtención de Halos de Potencia frente a sus respectivos antibióticos, para lo cual se deben elaborar determinadas diluciones, en las que se incluyen:

2.8.1.3.1 Preparación del estándar

Para preparar una solución madre, se debe disolver una cantidad de estándar de referencia USP en un determinado antibiótico, pesando con exactitud todo el contenido del vial del estándar de referencia USP, cuando corresponda, después se debe diluir hasta la concentración requerida según lo indica. Y al final se debe conservar en un refrigerador para ser usado en el periodo especificado.

2.8.1.3.2 Preparación del inóculo: (Anexo N° 9)

Organismo de prueba

El microorganismo de prueba para cada antibiótico, se encuentra especificado según USP. En el caso de la Eritromicina es:

Tabla 2.8.1

Organismo de Prueba	Método Usado	Medio usado		Periodo de Incubación de Medios	Factor de dilución Sugerido	Tiempo sugerido de incubación de las suspensiones en refrigeración
		Inclinado	Recto			
Organismo de Prueba C- <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	1	1	1	24 horas	1:40	2 semanas

Fuente: USP 30 NF25 año 2007 Vol. 1, Pág. 115, Capítulo Generales.

2.8.1.3.3 Preparación de Capa Base y Capa Siembra

El medio de prueba para cada antibiótico, se encuentra especificado según USP. En el caso de la Eritromicina es:

Tabla 2.8.2

Antibiótico	Medio a usar (Según lista de número de medio) (436.102 (b))		Mililitros de medio a usar en Capa Base y Capa Siembra		Organismo de Prueba	Volumen sugerido de inóculo estandarizado a ser añadidos cada 100 mililitros de Capa Siembra	Temperatura de Incubación para los platos.
	Capa Base	Capa Siembra	Capa Base	Capa Siembra			
<i>Eritromicina</i>	11	11	21	4	C	1.5	32-35°C

Fuente: USP 30 NF25 Vol. 1 año 2007, Pág. 284.

2.9 VERIFICACIÓN DE PRUEBAS BÁSICAS DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS PREPARADOS

La verificación o comprobación de la calidad de los medios de cultivos a utilizar en todo ensayo microbiológico, permite certificar que estos cumplan con las características físicas, químicas, microbiológicas y con los requerimientos nutricionales necesarios para su uso en el crecimiento, aislamiento, reconocimiento y enumeración de diversos tipos de microorganismos. Permite además verificar si las condiciones de almacenamiento de dichos medios de cultivo son adecuadas y garantizar su conservación.⁸ Entre las pruebas están:

- **pH**

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

- **Esterilidad**

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante).

- **Estabilidad**

Es una medida importante de control de los medios de cultivos, debido a que es en los diferentes medios donde se desarrollaran crecerán y posteriormente se reproducirán los microorganismos de interés para determinado análisis.

8. (Merck. "Manual de Medios de Cultivo". 1994. Pág. 123)

- **Capacidad de crecimiento y reacción (viabilidad) (Anexo No. 10)**

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

3. HIPOTESIS

La liofilización permite la conservación de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 en condiciones de pureza, viabilidad y estabilidad para pruebas de potencia del Antibiótico Eritromicina en la Industria Farmacéutica.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Descripción del ámbito de estudio

El ensayo se realizó en el Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios, en el Centro de Diagnóstico y Referencia, tanto en el área de Virología, ubicado en el Costado Oeste de la Colonia 1 de Mayo, Distrito 7, y en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, en el área de Microbiología ubicado en la Calle 15 de Septiembre, de la Texaco Xolotlán 2 1/2 cuadra al Oeste, Managua Nicaragua.

4.2 Tipo de estudio:

El estudio propuesto, es de tipo pre experimental, descriptivo de corte transversal, con componente de desarrollo tecnológico.

4.3 Universo de Estudio

Se toma como población de estudio, la Cepa ATCC 9341 *Kocuria rhizophilia*.

4.4 Variables de Estudio

4.4.1 Variables Independientes de estudio

Temperatura

Presión

4.4.2 Variables dependientes de estudio

Pureza

Viabilidad

Estabilidad

Tiempo de Liofilización

4.5 Materiales (Anexos No. 11, 12 Y 13)

Se utilizaron materiales de laboratorio indicados para el proceso, entre los que se encuentran:

Procedimiento estandarizado para el análisis de Potencia de Antibióticos

Cristalería

- Platos Petri de vidrio de 100 mm x 20 mm
- Jeringa descartable 5 ó 10 ml
- Tubos de 125 mm x 25 mm o de 150 mm x 25 mm
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca de 16 x 15 ml o 18 x 150 ml
- Vidrio reloj
- Mortero y Pílon
- Balones: 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml
- Erlenmeyer de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml
- Pipeta Pasteur
- Pipetas serológicas: 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 11 ml
- Botellas de dilución de 160 ml
- Probetas: 50 ml, 100 ml, 1000 ml
- Becker de vidrio 30 ml, 1000 ml

4.6 Equipos

- Baño María 42°C
- Plato caliente
- Balanza Analítica (Ohaus)
- Agitador Eléctrico: Vortex Genie 2, Scientific Industries Watts 1118, Vol. 120/60, Ser. 775960363210
- Micropipetas Automáticas de 500 a 1000 ml
- Termómetro (0 a 200°C)

- Incubadora Precisión Scientific, Modelo 6, Serie: 26 AHZ
- Lector de zona de inhibición, Modelo: 290 cat. : 7-906, serie: 90100007
- Cilindro de acero inoxidable: diámetro externo 8 mm, diámetro interno 6 mm y longitud 10 mm
- Espectrofotómetro UV Visible, Marca: Shimadzu, Serie: A11024234339CS
- Liofilizador Telstar, modelo Lyo Alfa 6

4.7 Medios de Cultivo y Reactivos (Anexo No. 2)

- Agar Sangre de carnero
- Agar Tripticasa Soya
- Agar Antibiótico No. 1, 11
- Caldo Nutriente
- Solución Salina al 0.9%
- Buffer No. 3.
- Agua destilada
- Estándar de Eritromicina USP
- Metanol

4.8 Reactivos de Tinción de Gram

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol Acetona
- Safranina

4.9 Instrumentos para recolectar información

- Manual para la vigilancia de S. Pneumoniae y H. Influenzae- Instituto Nacional de Salud- Red Nacional de Laboratorios
- Norma para la Preparación y Producción de Medios de Cultivo ISO 11133-1:2000
- Normas para citas Bibliográficas ISO 690-1987, 690-2

- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos V
- Merck. “Manual de Medios de Cultivo”. 1994
- Jawetz, Melnick y Adelberg. “Microbiología Medica”. 17va Edición. Manual Moderno. 2002

4.10 Materiales para procesar información:

- Tablas
- Esquemas
- Diagramas
- Figuras
- Dibujos
- Gráficos

4.11 Operacionalización de Variables

Variable	Indicador		Valor	Criterio
Liofilización	Concentración de Inoculo Bacteriano		20-30 μ l	Concentración mínima y máxima de Inoculo bacteriano
	Tiempo de Liofilización		1-5 Horas	Duración del proceso de desecación del inoculo.
Control de medios de Cultivo	Caldo Nutritivo	pH	Cumple	6.8 ± 0.2
		Crecimiento	O No cumple	Turbidez o crecimiento bacteriano
		Esterilidad		Crecimiento o no Crecimiento en 2 días de Incubación
	Agar Trypticasa Soya	pH	Cumple	7.3 ± 0.2
		Crecimiento	O No cumple	Turbidez o crecimiento bacteriano
		Esterilidad		Crecimiento o no Crecimiento en 2 días de Incubación
	Agar Antibiótico # 1	pH	Cumple	6.5 ± 0.05
		Crecimiento	O No cumple	Turbidez o crecimiento bacteriano
		Esterilidad		Crecimiento o no Crecimiento en 2 días de Incubación
	Agar Antibiótico # 11	pH	Cumple	7.95 ± 0.05
		Crecimiento	O No cumple	Turbidez o crecimiento bacteriano
		Esterilidad		Crecimiento o no Crecimiento en 2 días de Incubación

Cepa <u>Kocuria</u> <u>rhizophilia</u> <u>ATCC 9341</u>	Pureza	Tinción de Gram	Cocos Gram+ Cocos Gram -	Bacterias redondas color violeta azulado
		Coloración	Colonias amarillas O Colonias no amarillas	Crecimiento bacteriano característico de la cepa en análisis
		Formación de Colonias	UFC O No UFC	Presencia UFC
	Viabilidad	Crecimiento 4/4 Cuadrantes	Si O No	Crecimiento en al menos 2 de los 4 cuadrantes de los platos
Estabilidad acelerada	Pureza		Si hubo crecimiento puro O No hubo crecimiento puro	Colonias características de <u>Kocuria rhizophilia ATCC</u> <u>9341</u>
	Viabilidad		Crecimiento 4/4 cuadrantes	Crecimiento en al menos 2 de los 4 cuadrantes de los platos.
	Compatibilidad con material de envase		Aceptable O No aceptable	No variación de color en el crecimiento. No variación de pureza en bacteria. No variación viabilidad.

4.12 Protocolo de Referencia

Instituto Nacional de Salud	Versión N° 4	Página 159 de 177
Red Nacional de Laboratorios	Fecha de revisión: Junio de 2004	
Grupo: Microbiología	Fecha de creación: 1994	
Manual para la vigilancia de <i>S. pnemoneae</i> y <i>H. influenzae</i> .	Aprobado por: Subdirectora de investigación.	

2. Métodos de preservación de larga duración.

Liofilización.

Generalidades:

La liofilización es un proceso por el cual el vapor de agua es removido directamente del producto congelado, por medio de sublimación. El sistema se ha utilizado por muchos años para preservar una gran cantidad de materiales biológicos que son sensibles al calor. La naturaleza no destructiva de esta técnica se ha demostrado por la viabilidad observada con virus y microorganismos liofilizados.

Para la liofilización los microorganismos se resuspenden en un medio apropiado que les sirve de soporte y reduce el daño producido por la congelación, se almacenan los viales, se congelan y se exponen a un sistema de vacío, donde el agua es removida y convertida en vapor, sin pasar por el estado líquido. El resultado es un producto soluble en agua que puede ser fácilmente rehidratado.

Preparación de las cepas bacterianas:

Medio de soporte:

En general todos los aislamientos bacterianos se pueden liofilizar utilizando como medio de soporte leche descremada al 20 %. Existen algunas excepciones como son especies de los géneros: *Campylobacter*, *Helicobacter* sp y *Neisseria gonorrhoeae*, que no resisten la liofilización.

Procedimiento:

- Obtenga un cultivo puro, de 18-24 h, en un medio enriquecido, no selectivo (sin antibióticos o sustancias inhibidoras), del microorganismo que se va a liofilizar.
- Realice una suspensión del microorganismo, utilizando el crecimiento de una caja del cultivo puro por 1 ml de leche descremada estéril (al 20 %).
- Coloque la suspensión en el vial o ampollita apropiada de acuerdo con el equipo que se utilice.

Los viales deben ir debidamente marcados de acuerdo con el sistema de identificación que el laboratorio utilice.

- Congele a -70° C.
- Liofilice los aislamientos (el tiempo de liofilización depende del equipo que se utilice).

Instituto Nacional de Salud	Versión N° 4	Página 160 de 177
Red Nacional de Laboratorios	Fecha de revisión: Junio de 2004	
Grupo: Microbiología	Fecha de creación: 1994	
Manual para la vigilancia de <i>S. pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i> .	Aprobado por: Subdirectora de investigación.	

Liofilización de grupos específicos.

Neisseria: para la liofilización se utiliza un medio que contenga caldo de Tripticasa Soya con lactosa al 6%. El resto del proceso se realiza de igual manera.

Anaerobios: para los anaerobios en general la ATCC usa un crioprotector compuesto por:

Caldo Tripticasa	1.5 g
Sacarosa	10.0 g
Albumina bovina fracción V	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Almacenamiento de los viales

Los viales sellados con la grafa metálica deben ser almacenados en refrigeración entre 2 a 8°C.

Recuperación del liofilizado

Desinfecte el tapón del vial con gasa impregnada con alcohol y flamee. Rehidrate el liofilizado del cultivo con 1 ml de caldo nutritivo estéril, utilizando una jeringa, resuspenda y con la misma jeringa retire la suspensión del vial. Siembre la suspensión en un caldo nutritivo y en medios sólidos de acuerdo con el microorganismo que se va a recuperar.

Control de esterilidad y de viabilidad de las cepas

El control debe realizarse antes y después de la liofilización para poder determinar la efectividad del proceso. También debe hacerse un control periódico para determinar el tiempo de viabilidad de cada microorganismo.

Para realizar el control de viabilidad y esterilidad de las cepas liofilizadas, debe emplearse el 10 % de los viales, reconstituir con 1 ml de caldo nutritivo estéril, sembrar en el medio adecuado e incubar por 18 horas. Se considera buen crecimiento, cuando la cepa crece en dos de los cuatro cuadrantes del medio.

Instituto Nacional de Salud	Versión N° 4	Página 161 de 177
Red Nacional de Laboratorios	Fecha de revisión: Junio de 2004	
Grupo: Microbiología	Fecha de creación: 1994	
Manual para la vigilancia de <i>S. pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i> .	Aprobado por: Subdirectora de investigación.	

Medio de leche descremada

Descripción.

La leche descremada se usa como un medio completo, o como ingrediente de otro medio especial, para la propagación de microorganismos en productos lácteos. El polvo de leche descremada es un polvo desecado a partir de grandes volúmenes de leche descremada, es soluble y fácil de preparar. La leche descremada al 20% es usada como crioprotector para conservar microorganismos aeróbicos y anaeróbicos a -70°C así como para el proceso de liofilización de la mayoría de los microorganismos incluyendo levaduras y hongos.

Composición química.

Bacto-skimmilk Difco 0032 es un producto estandarizado, recomendado como medio de cultivo que cuando se reconstituye equivale a leche desnatada fresca.

Preparación.

- Disuelva 20 gramos del medio deshidratado en 100 ml de agua destilada o desionizada.
- Distribuya 10 ml en tubos de tapa de rosca de 150/15 mm.
- Esterilice a 116°C por 10 minutos

Tenga cuidado en evitar sobrecalentamiento o que la leche tome un color caramelo ya que de esta manera no conserva los microorganismos. La duración del medio es de 2 meses. El pH del medio debe mantenerse a $6,1 \pm 0,2$.

Control de calidad

Para el control de esterilidad, incube un tubo durante 48 horas y luego realice la siembra en agar sangre de cordero al 5%.

Procedimiento para almacenar las cepas.

Este procedimiento debe realizarse en cabina de bioseguridad II

- Para obtener una buena conservación se debe partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas en un medio no selectivo.
 - Dispense de 1 a 1,5 ml de la leche descremada estéril en un tubo plástico resistente a la congelación (crioviales) 2 ml.
 - Haga una suspensión densa del microorganismo.
- Para *S. pneumoniae*, utilice una caja de crecimiento por vial
- Para *H. influenzae*, utilice $\frac{1}{2}$ caja de crecimiento por vial
- Rotule el vial con el código correspondiente de la cepa y la fecha de recolección.

Los viales deben ser marcados con una tinta que resista bajas temperaturas y almacenados en cajas especiales, debidamente marcadas.

Instituto Nacional de Salud	Versión N° 4	Página 162 de 177
Red Nacional de Laboratorios	Fecha de revisión: Junio de 2004	
Grupo: Microbiología	Fecha de creación: 1994	
Manual para la vigilancia de S. pnemoneae y H. influenzae.	Aprobado por: Subdirectora de investigación.	

- Coloque el criovial en una caja de almacenamiento con tapa resistente al frío.
- Guarde la caja a la temperatura elegida (-20°C a -70° C).
- Para almacenar el nitrógeno líquido (-140°C o -196°C), se utilizan las escalerillas grapadas.

Cuando desee recuperar el microorganismo a partir del criovial, tenga en cuenta que la descongelación debe ser un proceso rápido, debido a que su prolongación produce daño en las células y disminuye la viabilidad del microorganismo. Proceda de la siguiente manera:

- Saque el criovial de la congelación.
- Tome con una asa estéril flameada y caliente, una pequeña parte del material congelado, con el fin de no descongelar todo el vial.
- Siembre el microorganismo en los medios de cultivo necesarios para su recuperación en el menor tiempo posible.
- Guarde inmediatamente el criovial a – 70°C.

4.13. PROCEDIMIENTOS

En base a las variables de estudio, se obtuvieron los siguientes resultados:

4.13.1 Concentración del inóculo bacteriano: Kocuria rhizophilia ATCC 9341 a liofilizar, y tiempo de liofilización.

Previo a la realización de los ensayos, se prepararon los crioviales a liofilizar de la siguiente manera:

Partiendo de la cepa Kocuria rhizophilia ATCC 9341, se tomaron asadas en condiciones estériles, y se pasaron a tubos de Caldo Nutritivo o Nutriente, se incubó por 24 horas a 30-35° C de Temperatura. Habiendo presencia de turbidez a las 24 horas de la incubación, se continuó agitando para unificar el crecimiento y pasando de 2 a 3 asadas de los tubos de Caldo N. a frascos de Agar Tripticasa Soya, los que se incubaron 24 horas a 30-35° C.

Pasadas las 24 horas y verificado el crecimiento, se procedió a probar viabilidad de la cepa, haciendo pases de asadas de los frascos con Caldo N. a platos de Agar Sangre de Carnero divididos en 4 cuadrantes, como lo indica el procedimiento de viabilidad (*Anexo No. 10*), estriando consecutivamente en los 4 cuadrantes de los platos e incubando por 24 horas (Todo en condiciones estériles).

Después de 24 horas, se realizó la lectura de crecimiento, teniendo como resultado, crecimiento abundante en 4 de los 4 cuadrantes inoculados, a continuación se realizaron las respectivas Tinciones de Gram, para determinar la pureza y morfología de la bacteria, resultando presencia de Cocos Gram positivos, agrupados en paquetes de 2 a más y con una coloración amarilla intenso.

Teniendo en cuenta este último resultado exitoso, se procedió a recoger el crecimiento de los frascos de Agar Tripticasa Soya, agregando 1.5 ml de leche descremada estéril al 20 % y con ayuda de perlas de vidrio estériles, se agitó constantemente para retirar todo el crecimiento.

El crecimiento obtenido de los frascos se unificó en un Erlenmeyer estéril y se procedió a alicuotar las muestras en crioviales estériles, agregando distintas cantidades para liofilizar y 1 ml a los crioviales para almacenar como lo indica la tabla 5.1.1.

Seguidamente, se prepararon los crioviales a liofilizar, cubriendo la abertura de estos con papel aluminio estéril y agujerado, posteriormente se colocaron en los beakers propios del equipo Liofilizador y se congelaron junto a los viales de almacenamiento a -70°C por 24 horas.

Una vez preparados los crioviales a liofilizar y almacenar, se realizaron distintos ensayos, variando cantidad de crioviales, concentraciones de inóculo bacteriano y tiempos de liofilización, a fin de identificar la menor concentración de inóculo bacteriano y tiempo de liofilización, a los cuales se obtuvieran líofilos de bacteria puros, viables y estables (**Anexo 6**), esto mediante el montaje de las pruebas correspondientes, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 5.1.1

Control de Ensayos de Liofilización.			
N° de Ensayo	Almacenamiento	Liofilización	Tiempo
1era Liofilización	2 crioviales de 1ml	4 crioviales de 200 μl	5 horas
		3 crioviales de 250 μl	
		4 crioviales de 300 μl	
2da Liofilización	5 crioviales de 1 ml	3 crioviales de 20 μl	1 hora 20 minutos
		3 crioviales de 30 μl	
		3 crioviales de 40 μl	
		3 crioviales de 50 μl	
3ra Liofilización	7 crioviales de 1 ml	5 crioviales de 20 μl	1hora: 30minutos
		5 viales de 30 μl	

Fuente: Formato de Resultados. Los valores de Tiempo de Liofilización y concentración de inóculo bacteriano obtenidos en los primeros 2 ensayos como se demostró en la tabla

5.1.1 No se tomaron como validos y sirvieron como pauta para la estandarización de un tercer ensayo.

3er Ensayo de Liofilización:

Para almacenamiento en este tercer ensayo, se hicieron uso de 7 viales con 1 ml de muestra, y para Liofilización fueron 10 crioviales con concentraciones de 20 y 30 µl, para los cuales la liofilización tuvo una duración de 1 hora y 30 minutos, considerando este ensayo como el mejor de todos.

Para las pruebas de pureza y viabilidad de los liofilizados, se tomo 1 criovial de cada una de las diferentes concentraciones analizadas, y se procedió según el esquema de pureza y viabilidad (*Anexos 10 y 14*)

Se reconstituyeron los viales (*Anexo No. 4*) con 1 ml de Caldo Nutritivo estéril, se agitaron, se tomaron alícuotas de cada muestra correspondiente a cada criovial se pasaron a frascos y a platos de Agar Tripticasa Soya 4 cuadrantes e incubaron por 24 horas, 30-35°C.

Tabla 5.1.2

Resultados viabilidad-pureza Primeros liofilizados.			
	Concentración por vial	Viabilidad	Pureza (Tinción Gram)
1er Ensayo	1 criovial 300 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
	1 criovial 250 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
	1 criovial 200 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
2 do Ensayo	1 criovial 50 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
	1 criovial 40 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
3er Ensayo	1 criovial 30 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +
	1 criovial 20 µl	4 Cuadrantes	Cocos Gram +

Fuente: Formato de Resultados

Se procedió posteriormente a la preparación de los lotes oficiales para análisis.

4.13.2 Pruebas de control de calidad a los medios de cultivos para la recuperación de la bacteria Kocuria rhizophilia ATCC 9341

Se determinaron los aspectos elementales de pH, esterilidad, promoción de crecimiento y estabilidad a medios de cultivo que se utilizaron durante toda la investigación, según lo indica el “Manual de medios de Cultivo, Merck (1994)”, de manera que se garantizara la óptima función de estos a la hora del montaje de cada una de las pruebas ensayadas (*Según esta indicado en el marco de referencia, pagina 25*)

- **pH**

Se determinó el pH de los medios de cultivo con pH-metro previamente calibrado, a la temperatura recomendada por el fabricante, cuando la condición de temperatura no estuvo especificada, se realizo a 25-26°C.

- **Esterilidad**

El número total de placas Petri, tubos, y frascos de los medios de cultivo preparados se incubaron a 35-37°C durante 24-48 horas.

- **Capacidad de crecimiento y reacción (viabilidad)**

La promoción del crecimiento se determino por diferentes métodos:

Medios selectivos y diferenciales: Sólidos.

Se dividió el plato en tres secciones, y se inocularon tres diferentes microorganismos en cada sección, seleccionando un microorganismo que su crecimiento es inhibido por el medio, otro microorganismo que crezca con sus características y un microorganismo que crezca no con las características esperadas. Luego se incubaron por 24 horas a 35-37°C y se verifico el crecimiento.

Medios líquidos:

Se prepararon suspensiones bacterianas con $1-3 \times 10^2$ bacterias/ml y se sembró en placa adicionando 15-18 ml del medio de cultivo, se agito con movimientos circulares, y se dejo solidificar e incubar por 24 horas a 35-37 °C. Luego se procedió al recuento en placas.

Medios Generales:

Se tomo 1 ml de la suspensión $1-3 \times 10^2$ bacterias/ml y se sembró en placa adicionando 15-18 ml del medio de cultivo, se agito con movimientos circulares, se dejo solidificar y se incubo por 24 horas a 35-37 °C. Se procedió al recuento en placa.

• **Estabilidad (Anexo No. 5)**

Cada 8 días se verifico la estabilidad y pH de los medios de cultivo para comprobar su buen estado. Cabe destacar, que los medios utilizados, se seleccionaron siguiendo la guía del protocolo de referencia. Se obtuvieron los siguientes resultados:

PRUEBAS BASICAS DE MEDIOS PREPARADOS

Nombre del medio de cultivo	Valores de pH		Esterilidad	Promoción de crecimiento
	Fabricante	Prueba		
Caldo Nutriente	6.8 ± 0.2	6.80	Cumple	Cumple
Agar Tripticasa Soya	7.3 ± 0.2	7.28	Cumple	Cumple
Agar Antibiotico # 11	7.95 ± 0.05	7.94	Cumple	Cumple
Agar Antibiotico # 1	6.5 ± 0.05	6.48	Cumple	Cumple

Fuente: Planilla de verificación de control de calidad de los medios.

Según los resultados, el 100% de los medios de cultivo, cumplieron con los parámetros analizados, por lo que resultaron adecuados para el experimento.

4.13.3 Pureza y Viabilidad de la cepa control Kocuria rhizophilia ATCC 9341 y de los liofilizados. (Anexo No. 10 y 14)

Para hacer el estimado de la pureza y viabilidad de los liofilizados, se prepararon 10 lotes de viales con 10 viales cada uno de la siguiente manera:

Haciendo uso de uno de los viales en almacenamiento, se pasaron asadas de este a tubos de caldo nutritivo, y de estos tubos al mismo tiempo se tomaron asadas y se pasaron a platos de Agar Trypticosa Soya 4 cuadrantes, ambos se incubaron 24 horas a 30-35°C.

Después de 24 horas, hubo presencia de turbidez en los tubos y se comprobó la viabilidad en 4 cuadrantes de los platos, obteniendo resultados exitosos. Se continuó el proceso, haciendo pases de los tubos de caldo a frascos de Agar Trypticosa Soya y se incubaron 24 horas a 30-35°C.

Resultó crecimiento en todos los frascos de 45 ml inoculados con colonias características de la cepa Kocuria rhizophilia, se procedió a recoger el crecimiento agregando 1 ml de Leche descremada estéril 20% y perlas estériles de vidrio, con agitación, se retiró todo el crecimiento y se unificó en un solo frasco del que se distribuyeron la cantidad de 20 µl en 100 viales que constituyeron los 10 lotes principales a analizar (10 lotes de 10 viales cada uno). Es importante destacar que para determinar errores de análisis las alicotadas de los viales fueron realizadas por 4 analistas diferentes.

Se congelaron los viales a -70° C por 24 horas. Una vez cumplido el tiempo, se continuó con la liofilización de estos. Una vez obtenidos los liófilos, se ordenaron por lotes, se tomaron 2 viales al azar de cada uno de ellos (20 en total), a los cuales se les realizaron las pruebas de viabilidad y pureza en comparación con la cepa ATCC de la manera siguiente:

Se tomaron 10 de los 20 crioviales seleccionados en sus órdenes correspondientes por lotes, se reconstituyeron (1ml de Caldo N.) y se incubaron por 24 horas a 30-35° C, esto para prueba de viabilidad. Se tomaron los otros 10 viales y se realizó prueba de pureza pasando asadas a platos de Agar Trypticosa Soya e incubando 24 horas a 30-35°C. De estos mismos

viales se realizó tinción de Gram, resultando en cada uno de ellos presencia de cocos Gram + (*Anexo No. 6 y página 17 Marco de referencia*)

De la misma manera, se tomaron asadas de la cepa ATCC a un tubo de Caldo Nutritivo y se incubo 24 horas en 30-35°C. pasadas las 24 horas, y verificada la turbidez, se paso a platos de Tripticasa Soya 4 cuadrantes para verificar su viabilidad.

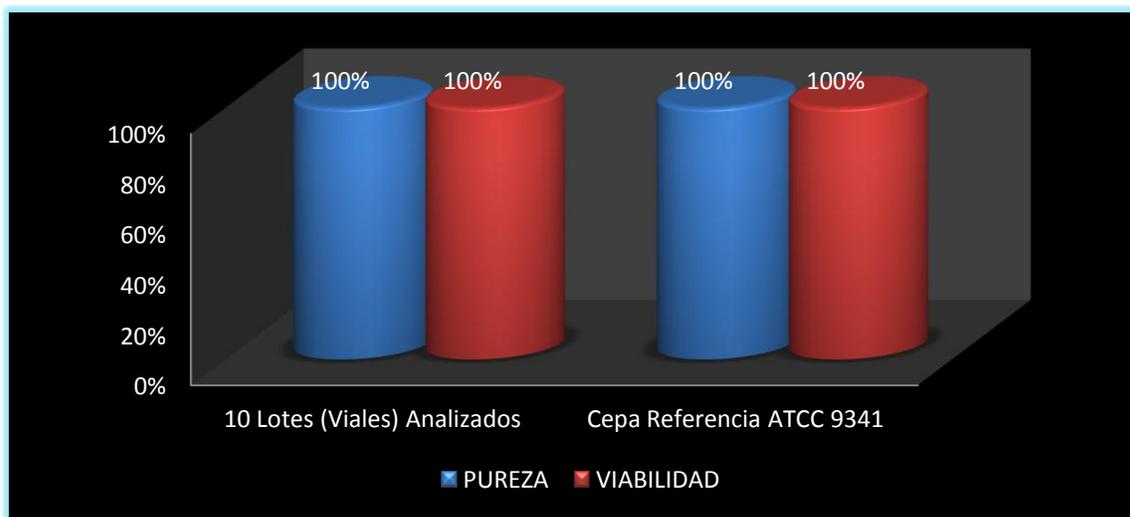
Los resultados en cada uno de los lotes analizados para prueba de pureza fueron exitosos, con presencia abundante de crecimiento amarillo fuerte en los platos, indicio la presencia de la cepa *Kocuria rhizophilia*

Continuando con la prueba de viabilidad, se tomaron los 10 primeros crioviales reconstituidos e incubados y se pasaron a platos de Agar Tripticasa Soya 4 cuadrantes y se incubaron 24 horas a 30-35°C.

NOTA: Al mismo tiempo se realizaron pases de estos viales y de la cepa ATCC a tubos de Agar Antibiótico # 1 (uno por cada lote), para ser utilizados posteriormente en la prueba de obtención de Halos de Potencia.

El crecimiento una vez cumplido el tiempo fue abundante en cada uno de los 4 cuadrantes de los platos, tanto de los 10 crioviales analizados como el de la cepa de referencia ATCC, dando resultados en viabilidad exitosos.

Grafica 5.3.1



Fuente: Formato de Resultados

4.13.4 Estabilidad acelerada de los liofilizados.

La estabilidad acelerada de los liofilos, se realizó, seleccionando inicialmente 7 viales al azar de los 10 lotes liofilizados, con la principal condición de que pertenecieran al mismo analista. Tomándose en cuenta los aspectos a evaluar, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 5.4.1

Día	Reconstitución	T° y Tiempo de Incubación	Aspecto		Esterilidad de los medios (Anexo N° 17)	Compatibilidad con material de almacenamiento
			Viabilidad	Tinción Gram		
1	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable
2	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable
3	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable
4	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable

5	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable
6	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable
7	1 ml C.N	37° ± 20°C – 24 Hrs	4/4 C, colonias amarillas	Cocos Gram +	Cumple	Aceptable

Fuente: Formato de Resultados

4.13.5 Obtención de Halos de Potencia

El ensayo de obtención de Halos de Potencia se realizó con el propósito de demostrar que los liofilos obtenidos, además de ser viables, puros y estables, también son efectivos para garantizar el montaje de análisis de potencia de Antibióticos (Eritromicina), esto como información adicional que fundamenta el éxito de la técnica empleada.

Para esto, se realizó la preparación de diferentes disoluciones y se hizo uso de un estándar USP del antibiótico para el cual trabaja la bacteria *Kocuria rhizophilia* que es el de Eritromicina, y se hizo de la siguiente manera:

CALCULOS:

Cuadro 5.5.1

$\frac{(862.07) \times (25 \text{ mg})}{733.94} = 29.36 \text{ mg (Cantidad a pesar de estándar)}$ <p style="text-align: center;">P.M Sal de Estearato</p> <p style="text-align: center;">Peso molecular Base Eritromicina</p>	<p style="text-align: center;">Cantidad USP</p>
--	---

Cuadro 5.5.2

$\frac{29.4 \text{ mg} \times 947.7917 \mu\text{g/ml}}{50 \text{ ml}} = 559.197103 \mu\text{g}$ <p style="text-align: center;">Cantidad De Estándar</p> <p style="text-align: center;">Potencia Estándar</p>
--

Cuadro 5.5.3

Diluciones según USP:

S1: 15.9

S2: 20.4

S3: 22.74

S1: $15.9 \times 25 \text{ ml} / 559.19 \mu\text{g} = \underline{0.7\text{ml.}}$

S2: $20.4 \times 25 \text{ ml} / 559.19 \mu\text{g} = \underline{0.91 \text{ ml.}}$

S3: $22.74 \times 25 \text{ ml} / 559.19 \mu\text{g} = \underline{1.01 \text{ ml.}}$

Fuente: Formato de Resultados

a. Preparación del estándar

Se pesaron 29.36 mg de estándar de referencia USP Norteamericana de Eritromicina Estearato, se disolvieron en 50 ml del diluyente Metanol, de esta dilución se tomaron 2.7 ml y se aforó a 25 ml con Buffer #3 (Solución tampón). Seguidamente se tomaron 25 ml y se rotularon como S1, S2, y S3 respectivamente.

-Al balón rotulado con S1, se le adicionó 0.7 ml de la solución trabajo y se diluyó con Buffer #3 hasta la marca de aforo.

-Al balón rotulado S2, se le adicionaron 0.9 ml de la solución trabajo y se aforo con Solución Tampón.

-Al balón rotulado S3, se adiciono 1 ml de la solución trabajo y se aforo con Solución Tampón.

b. Preparación de Capa Base:

Con ayuda de una pipeta serológica de 25 ml y con ayuda de un dispensador automático se agrego 21 ml de medio fundido a cada plato Petri.

Seguidamente se distribuyó el medio suavemente para cubrir todo el fondo del plato, y se colocó la tapa, dejando solidificar. Una vez endurecido el medio se incubo por 15 minutos a 30-35°C para evitar el agua condensada y se procedió a colocar la capa Siembra.

c. Preparación de Capa Siembra:

Para la preparación de la capa siembra, fue necesario, recoger el crecimiento de los tubos de Agar Antibiótico # 1 incubados anteriormente de cada uno de los 10 lotes analizados (al mismo tiempo se hizo prueba de viabilidad), colocando 1 ml de NaCl previamente preparado y con ayuda de asa estéril se removió el crecimiento y se colocó en Erlenmeyer individuales, ordenados por número de lote.

Se procedió a la lectura de porcentaje de transmitancia en espectrofotómetro para saber la concentración a la cual se encontraba cada suspensión bacteriana de cada lote y con estos datos, se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de inóculo de cada suspensión a utilizar como capa siembra:

Tabla 5.5.1

% De transmitancia	Suspensiones bacterianas
Lote 1: 85.0%	Lote 6: 84.4%
Lote 2: 84.2%	Lote 7: 83.7%
Lote 3: 89.4%	Lote 8: 89.6%
Lote 4: 87.8%	Lote 9: 88.0%
Lote 5: 89.0%	Lote 10: 86.2%

Fuente: Formato de Resultados

Tabla 5.5.2.

CALCULOS:	
Dato USP: 1.5 ml - 25%	
Lote 1: (1.5 ml) (85.0%) / 25% = 5.1 ml.	Lote 6: (1.5 ml) (84.4%) / 25% = 5.0 ml.
Lote 2: (1.5 ml) (84.2%) / 25% = 5.0 ml.	Lote 7: (1.5 ml) (83.7%) / 25% = 5.0 ml.
Lote 3: (1.5 ml) (89.4%) / 25% = 5.3 ml.	Lote 8: (1.5 ml) (89.6%) / 25% = 5.3 ml.
Lote 4: (1.5 ml) (87.8%) / 25% = 5.2 ml.	Lote 9: (1.5 ml) (88.0%) / 25% = 5.2 ml.
Lote 5: (1.5 ml) (89.0%) / 25% = 5.3 ml.	Lote 10: (1.5 ml) (86.2%) / 25% = 5.1 ml

Fuente: Formato de Resultados

Se conecto a la fuente de energía un Hot Plate/Agitador, programándolo a una temperatura de 50°C a 500 RPM.

Las suspensiones recogidas con anterioridad de cada lote, se depositaron en 100 ml de Agar Antibiótico # 11, del cual seguidamente se tomaron las cantidades de inóculo determinadas según cálculos previos de cada uno y se agregaron a cada plato ya conteniendo la capa base, se inclino hacia atrás tratando de distribuir al frente el agar inculado en forma uniforme sobre la capa base, dejándolo solidificar.

Se coloco inmediatamente sobre la superficie del agar inculado 6 cilindros en cada plato de forma manual auxiliándose de una pinza estéril y asegurándose que quede un espacio de 2-3 mm entre los cilindros y el medio, no colocándolos de forma fuerte o brusca y cubriendo inmediatamente los platos para evitar así la contaminación. Posteriormente se dejaron 5 min en reposo para proceder al llenado de los cilindros, el cual fue de 170 µl del Antibiótico Eritromicina.

Llenado de Cilindros

Para llenar los cilindros, se realiza el siguiente procedimiento:

En el análisis se uso un total de 30 platos 3 platos por cada lote analizado, en cada plato se llenaron 6 cilindros alternos con las diluciones de referencia (S_1 , S_2 , S_3).

El llenado de los cilindros de los cilindros se realizo con una sola pipeta automática siguiendo el siguiente orden:

- Dilución S_1 vs S_1
- Dilución S_2 vs S_2
- Dilución S_3 vs S_3

Se dejaron en reposo los platos con los cilindros por un espacio de 20 minutos. Seguido se procedió a la incubación de los platos a la temperatura especificada (35-37°C, Protocolo USP) por un tiempo de 24 horas. Para finalizar, se realizo la lectura de los Halos de Inhibición.

5. ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Concentración de Inoculo bacteriano *Kocuria rhizophilia* a liofilizar y tiempo de Liofilización.

Resultados Ensayos de Liofilización							
		1er Ensayo		2do Ensayo		3er Ensayo	
Cantidad de Viales	Almac.	Liofilización	Almac.	Liofilización	Almac.	Liofilización	
		2	11	5	12	7	10
T°	-76° C		-76° C		-76° C		
Presión	0.05 Bar		0.05 Bar		0.05 Bar.		
Tiempo	5 Horas		1 Hora 20 Minutos		1Hora 30 Minutos		
Viabilidad	Crecimiento 4/4 cuadrantes		Crecimiento 4/4 cuadrantes		Crecimiento 4/4 cuadrantes		
Pureza	Colonias amarillas Cocos Gram +		Colonias amarillas Cocos Gram +		Colonias amarillas Cocos Gram +		

Teniendo en cuenta los resultados exitosos, se determino que la mínima concentración de inoculo y tiempo de liofilización a los cuales las variables de estudio se comprobaron optimas son de 20 µl en 1 hora 30 minutos. Cabe destacar que según la programación estándar del aparato Liofilizador, la temperatura de liofilización en todos los ensayos fue de -76° C a una presión de 0.05 Bar.

5.2 Verificación de pruebas de control de calidad de medios de cultivo para la recuperación de la bacteria liofilizada

Medio de Cultivo	pH		Esterilidad		Promoción de crecimiento		Estabilidad	
	Cumple	No cumple	Cumple	No cumple	Cumple	No cumple	Cumple	No cumple
Caldo Nutritivo	✓		✓		✓		✓	
Agar T/S	✓		✓		✓		✓	
Agar antib. #1	✓		✓		✓		✓	
Agar antib. #11	✓		✓		✓		✓	
Total: 4 (100%)	4 (100%)		4 (100%)		4 (100%)		4 (100%)	

Los 4 diferentes medios de cultivo utilizados para la identificación, crecimiento y recuperación tanto de la bacteria ATCC como de la bacteria liofilizada, cumplieron con las pruebas de control de calidad que se les establecieron (pH, esterilidad, promoción de crecimiento y estabilidad), según el “Manual de medios de cultivo” Merck 1994.

5.3 Pureza y Viabilidad de los liofilizados (*Anexo No. 15*)

Viales Liofilizados	Pureza (Colonias amarillas, cocos Gram +)	Viabilidad (Crecimiento 4/4 Cuadrantes del plato)
1er Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
2do Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
3er Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
4to Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
5to Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
6to Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
7mo Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
8vo Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si

9no Lote (10 crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
10mo Lote (10 V crioviales)	Colonias amarillas, cocos Gram+	Si
TOTAL: 100 crioviales Liofilizados – 100%	100%	100%

Cada uno de los 10 Lotes analizados cumplieron con los criterios de las pruebas de pureza y viabilidad, evidenciando presencia de crecimiento amarillo abundante en 4 de 4 cuadrantes de los platos con medio, y formación de colonias Gram +, siendo por lo tanto el 100% de los crioviales liofilizados puros y viables, según especificaciones.

5.4 Estabilidad acelerada de liofilizados (*Anexo No. 16*)

7% de los crioviales	PUREZA		VIABILIDAD		Compatibilidad con material de envase	
	Crecimiento puro	No crecimiento puro	4/4 cuadrantes	No 4/4 cuadrantes	Aceptable	No aceptable
1 criovial	✓		✓		✓	
2 criovial	✓		✓		✓	
3 criovial	✓		✓		✓	
4 criovial	✓		✓		✓	
5 criovial	✓		✓		✓	
6 criovial	✓		✓		✓	
7 criovial	✓		✓		✓	

Los 7 crioviales analizados por estabilidad acelerada, que constituyen el 7 % del total de 100 crioviales liofilizados, cumplieron con las pruebas establecidas de pureza, viabilidad y compatibilidad con el material de envase, según el procedimiento de estabilidad acelerada de liofilizados por lo que los estos resultaron ser estables por 7 días probados.

5.5 Obtención de Halos de Inhibición (*Anexo No. 17 y 18*)

Lote Analizado	Replicas por lote	Formación de Halos de Inhibición	
		Si	No
Lote 1	3 Placas	✓	
Lote 2	3 Placas	✓	
Lote 3	3 Placas	✓	
Lote 4	3 Placas	✓	
Lote 5	3 Placas	✓	
Lote 6	3 Placas	✓	
Lote 7	3 Placas	✓	
Lote 8	3 Placas	✓	
Lote 9	3 Placas	✓	
Lote 10	3 Placas	✓	
Total: 10 Lotes – 100%	33 Placas	✓	

Cada uno de los 3 platos por lote analizado, mostraron formación de Halos irregulares de Inhibición de crecimiento bacteriano al usarse el estándar de Eritromicina, lo que es una etapa inicial importante para el análisis de medición de Potencia de dicho antibiótico, demostrando así la eficacia de los Liofilizados.

6. CONCLUSIONES

1. Los valores de concentración del inóculo, obtenidos mediante los ensayos de liofilización (Cepa Kocuria rhizophilia) fueron de 20 µl y el tiempo de liofilización fue de 1 hora y 30 minutos.
2. Cada uno de los medios de cultivo utilizados en el ensayo, cumplieron con los parámetros establecidos para control de calidad de medios de pH, esterilidad, promoción de crecimiento y estabilidad
3. La pureza y viabilidad de la cepa se determinó mediante la comparación de la cepa de referencia (ATCC) y la cepa liofilizada. En pureza se verificó características de la cepa (coloración, forma de la colonia y tinción de gram), resultando en todos los 10 lotes procesados con similitud. La viabilidad se comprobó en cada lote con la especificación de 4/4 cuadrantes de crecimiento.
4. La estabilidad acelerada resultó satisfactoria ya que en los 7 días que se hizo cada uno de los lotes cumplió con la pureza y viabilidad de la cepa.

La Liofilización permite la conservación de la cepa Kocuria rhizophilia ATCC 9341 en condiciones viables, puras y estables y además es eficaz para ser utilizada en pruebas de Potencia de Eritromicina para la industria farmacéutica.

7. RECOMENDACIONES

A Instituciones públicas de Salud (MINSAs), Universidades, Laboratorios de Industrias Farmacéutica, Estudiantes y gremio en general:

1. Realizar estudios referentes a la aplicación de la Técnica de Liofilización, para que se logre su implementación de la misma en el País.
2. Comprobar la efectividad del Liofilizado de la Cepa *Kocuria rhizophilia* mediante el análisis de Potencia de Antibiótico Eritromicina.
3. Verificar la técnica de Liofilización en todas las cepas bacterianas de interés para la construcción de un Cepario Nacional para uso en control de calidad microbiológica de Medicamentos.
4. Establecer Normativas o Guías para el transporte, conservación y almacenamiento adecuado de los liofilizados.
5. Probar la estabilidad del Liofilizado con estudios de estabilidad no acelerada.
6. Realizar intercambio tecnológico con países que ya han realizado estudios de Liofilización Bacteriana.

BIBLIOGRAFIA

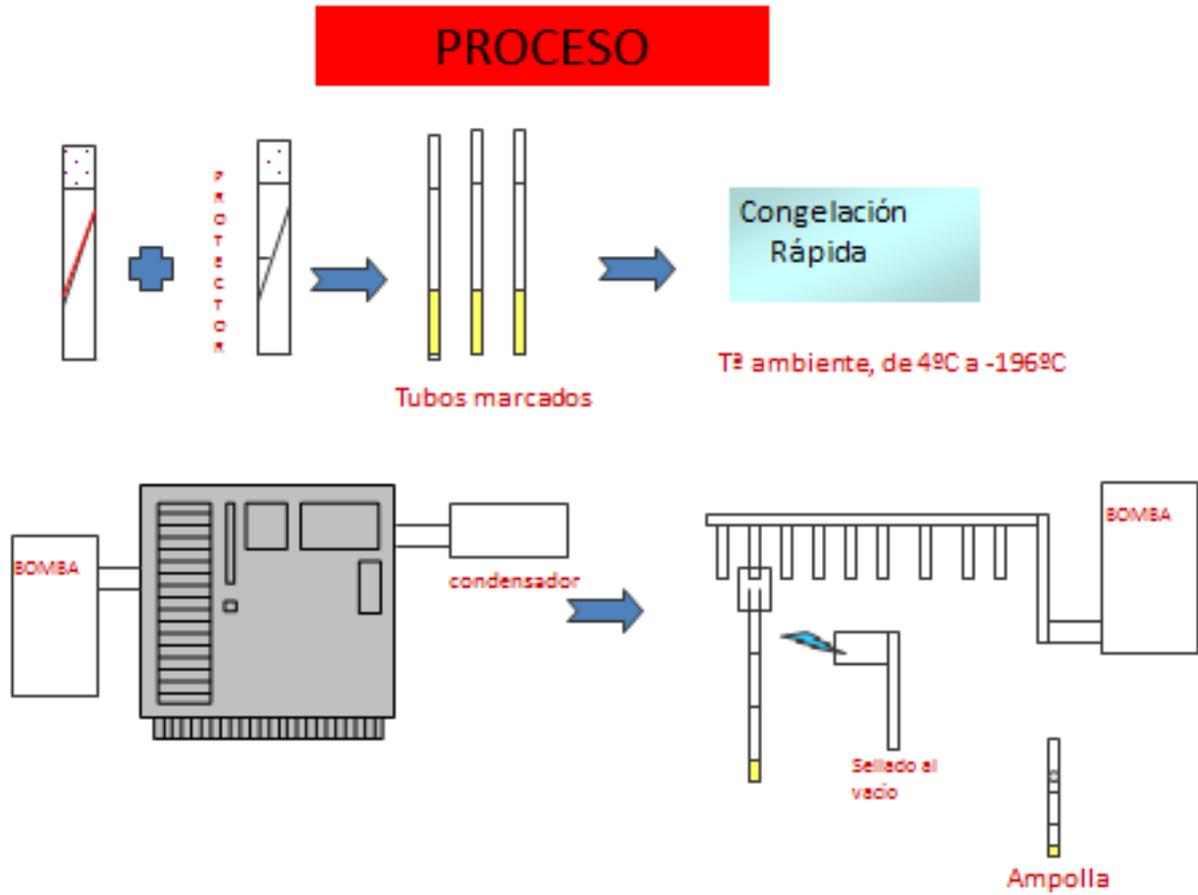
1. **AOAC** In *US FDA Bacteriological Analytical Manual*, 8th edn, pp. 20.01–20.04. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg 1995.
2. **Baird-Parker, AC.** Genus I. *Micrococcus* Cohn , 151. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, pp. 478–483. Edited by RE Buchanan & NE Gibbons. Editado por RE Buchanan y Gibbons NE. Baltimore: Williams & Wilkins 1974.
3. **British Pharmacopoeia Commission.** Biological assay of antibiotics. vol.2. London: The Stationery Office. 1993
4. **EDQM.** Microbiological assay of antibiotics. Valoración microbiológica de antibióticos. In *European Pharmacopoeia*, 3rd edn, p. En *la Farmacopea Europea*, tercera edición, p. EP 2.7.2. EP 2.7.2. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines. Estrasburgo: Dirección Europea de la Calidad de los Medicamentos 1997.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos V. Edición Pág. 1972 a 1983.
6. Food and Drug Administration (2000). Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
7. **ISO 11133-1:2000** Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivos. Parte 1: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de cultivo en el laboratorio.
8. Jawetz, Melnick y Adelberg. “Microbiología Medica”. 17va Edición. Manual Moderno. (2002)
9. Merck. “Manual de Medios de Cultivo”. (1994)
10. OGA-GEC-01 6. 2004. Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Oficina Guatemalteca de Acreditación para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Guatemala.
11. Sutton, S. 2005 Validation of Alternative Microbiology Methods for Product Testing Quantitative and Qualitative Assays. Pharmaceutical Technology. pp.119-122. United States Pharmacopoeia 26th Edition. Validation of Compendial Methods pp 2440-2442. United States Pharmacopoeial convention, INC. Impreso en Canadá. Válidada en Enero 2003.

WEBGRAFIA

- Directorio de Asociaciones de Consumidores de Nicaragua. Liga de Defensa del Consumidor de Nicaragua. <http://www.mific.gob.ni>
- Manual de Laboratorios para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330s/s16330s.pdf>
- Liofilización. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Seminario Liofilización. Baxter. 1999 <http://www.uv.es/~mbermejo/Freeze-Drying.pdf>
- Liofilizados Clean World Hispania S.L.. Suministro de liofilización de cultivos bacterianos. http://www.ctv.es/clean_world_hispania/liofilizados.htm
- Esterilización Tema 11 Esterilización Clase Asepsia y Antisepsia Exposición. <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2003>.
- The ATCC Bacteriology Collection. [http:// www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org)
- Medica-Tec de Chile: Cepas ATCC Licensed Derivative® individuales KWIK-STIK™ 4º Pasaje x unidad. Representaciones » Microbiologics|Lab. www.medica-tec.com

ANEXOS

Esquema Proceso de Liofilización



Planillas de resultados de verificación de calidad de medios de cultivo.

Nombre del medio de cultivo: Agar Trypticasa Soya.

Casa comercial: Laboratorios BRITANIA, S.A.

Número de Lote: 456.

Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación: 06 de Octubre 2011.

Cantidad pesada: 44 g.

Volumen de agua: 1000 ml.

Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos.

Temperatura de esterilización: 121 °C.

Presión de esterilización: 18 Libras.

Determinación del pH

Temperatura: 23 °C.

Temperatura: 26 °C.

pH de la etiqueta: 7.3 +/- 0.2.

Lectura pH: 7.28.

Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 21 frascos, 21 platos.

Fecha de inicio de incubación: 06 de octubre 2011.

¿Cumple esterilidad?: SI

Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Medio liquido	Medio solido
<i>Kocuria rhizophilia</i>	Cumple	Cumple

Nombre del medio de cultivo: **Caldo Nutriente.**

Casa comercial: Laboratorios BECTON, Dickinson and Company (BD)

Número de Lote: 118-03-66

Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación: 06 de Octubre 2011.

Cantidad pesada: 2.4 g.

Volumen de agua: 300 ml.

Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos.

Temperatura de esterilización: 121 °C.

Presión de esterilización: 18 Libras.

Determinación del pH

Temperatura: 23 °C.

Temperatura: 26 °C.

pH de la etiqueta: 6-8 +/- 0.2

Lectura pH: 6.80

Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 21 tubos.

Fecha de inicio de incubación: 06 de octubre 2011.

¿Cumple esterilidad?: SI

Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Medio liquido	Medio solido
<i>Kocuria rhizophilia</i>	Cumple	Cumple

Nombre del medio de cultivo: **Agar Antibiótico # 1**

Casa comercial: Laboratorios BRITANIA, S.A

Número de Lote: 025

Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación: 10 de Enero 2012.

Cantidad pesada: 2.74 g.

Volumen de agua: 90 ml.

Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos.

Temperatura de esterilización: 121 °C.

Presión de esterilización: 18 Libras.

Determinación del pH

Temperatura: 23 °C.

Temperatura: 26 °C.

pH de la etiqueta: 6.55 +/- 0.05

Lectura pH: 6.38

Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 9 tubos.

Fecha de inicio de incubación: 10 de Enero 2012

¿Cumple esterilidad?: SI

Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Medio liquido	Medio solido
<i>Kocuria rhizophilia</i>	Cumple	Cumple

Nombre del medio de cultivo: **Agar antibiótico # 11.**

Casa comercial: Laboratorios BECTON, Dickinson and company (BD)

Número de Lote: 703-6141

Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación: 19 de Octubre 2011.

Cantidad pesada: 30-5 g.

Volumen de agua: 1000 ml.

Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos.

Temperatura de esterilización: 121 °C.

Presión de esterilización: 18 Libras.

Determinación del pH

Temperatura: 23 °C.

Temperatura: 26 °C.

pH de la etiqueta: 7.9 +/- 0.2

Lectura pH: 7.94

Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 10 platos.

Fecha de inicio de incubación: 19 de octubre 2011

¿Cumple esterilidad?: SI

Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Medio liquido	Medio solido
<i>Kocuria rhizophilia</i>	Cumple	Cumple

Nombre del medio de cultivo: **Leche descremada 20%**.

Casa comercial: Laboratorios BECTON, Dickinson and company (BD)

Número de Lote: 023-5429

Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación: 29 de Septiembre 2011

Cantidad pesada: 30-5 g.

Volumen de agua: 1000 ml.

Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos.

Temperatura de esterilización: 121 °C.

Presión de esterilización: 18 Libras.

Determinación del pH

Temperatura: 23 °C.

Temperatura: 26 °C.

pH de la etiqueta: 6.3 +/- 0.2

Lectura pH: 6.2

Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 400 ml en 4 frascos de 100 ml

Fecha de inicio de incubación:

¿Cumple esterilidad?: SI

Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Medio liquido	Medio solido
<i>Kocuria rhizophilia</i>	Cumple	Cumple

Pasos para la preparación y almacenamiento de la cepa *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341 a liofilizar.

Polvo liofilizado de cepa original *Kocuria rhizophilia* ATCC 9341.



Pruebas de identificación.
(Tinción de Gram y pase a Medio selectivo Agar Tripticasa soya).



Caldo Nutriente (18-24 hrs)



Agar Tripticasa / soya (18-24 hrs)



Se recoge el crecimiento en un tubo estéril.



Se distribuye 1 ml en cada criovial
Y se almacena (-20/-70°C)

Se reconstituye una parte del polvo original.

Almacenamiento

Liofilización



Caldo Nutriente (18-24 hrs)



Agar Tripticasa / soya (18-24 hrs)

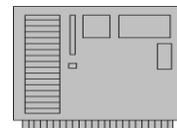


Suspensión de microorganismo



Se agregan 20 µl a cada criovial y se congelan a -70

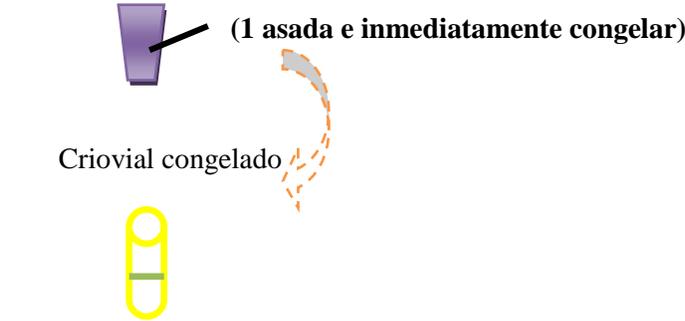
Liofilizar y almacenar 2-8°C



ANEXO No. 4.

Recuperación de la cepa bacteriana ATCC 9341 *Kocuria rhizophilia* del almacenado y liofilizado.

Recuperación almacenamiento



Caldo Nutriente (18-24 hrs)

Pruebas de identificación

Recuperación Liofilizados



Caldo nutritivo (18-24 hrs)

Viabilidad

Estabilidad



ANEXO No. 5

Procedimiento de estabilidad acelerada de Liofilizados:

1^{er} día: Incubación de 7 crioviales sin reconstituir 37°C 24 horas.

2^{do} día: Reconstitución 1° criovial e incubación 35°C 24 horas.

3^{er} día: - Pase consecutivo con asa estéril del 1° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 2° criovial e incubación 35°C 24 horas.

4^{to} día: -Lectura crecimiento 1°criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 2° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 3° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

5^{to} día: - Lectura crecimiento 2° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 3° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

- Reconstitución 4° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

6^{to} día: - Lectura crecimiento 3° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 4° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 5° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

7^{mo} día: - Lectura crecimiento 4 ° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 5° criovial plato Trypticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

- Reconstitución 6° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

8^{vo} día: - Lectura crecimiento 5° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 6° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C 24 horas.

- Reconstitución 7° criovial e incubación 35°C por 24 horas.

9^{no} día: - Lectura crecimiento 6 ° criovial.

- Pase consecutivo con asa estéril 7° criovial a plato Trypticasa Soya e incubación 35°C por 24 horas.

10^{mo} día: - Lectura crecimiento 7° criovial.

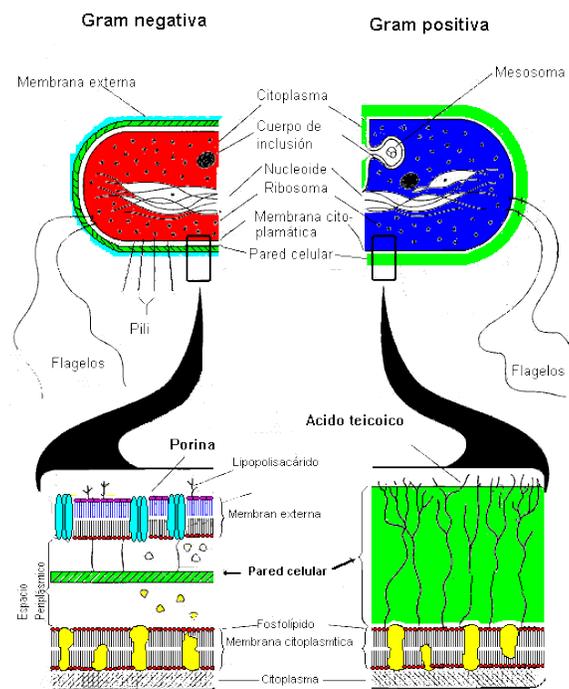
Notas:

➔ Para la reconstitución de los crioviales se hizo uso de 1 ml de Caldo Nutriente estériles.

➔ Los platos de Trypticasa Soya previamente se dividieron en 4 cuadrantes haciendo uso de bisturís estériles.

Procedimiento tinción de Gram

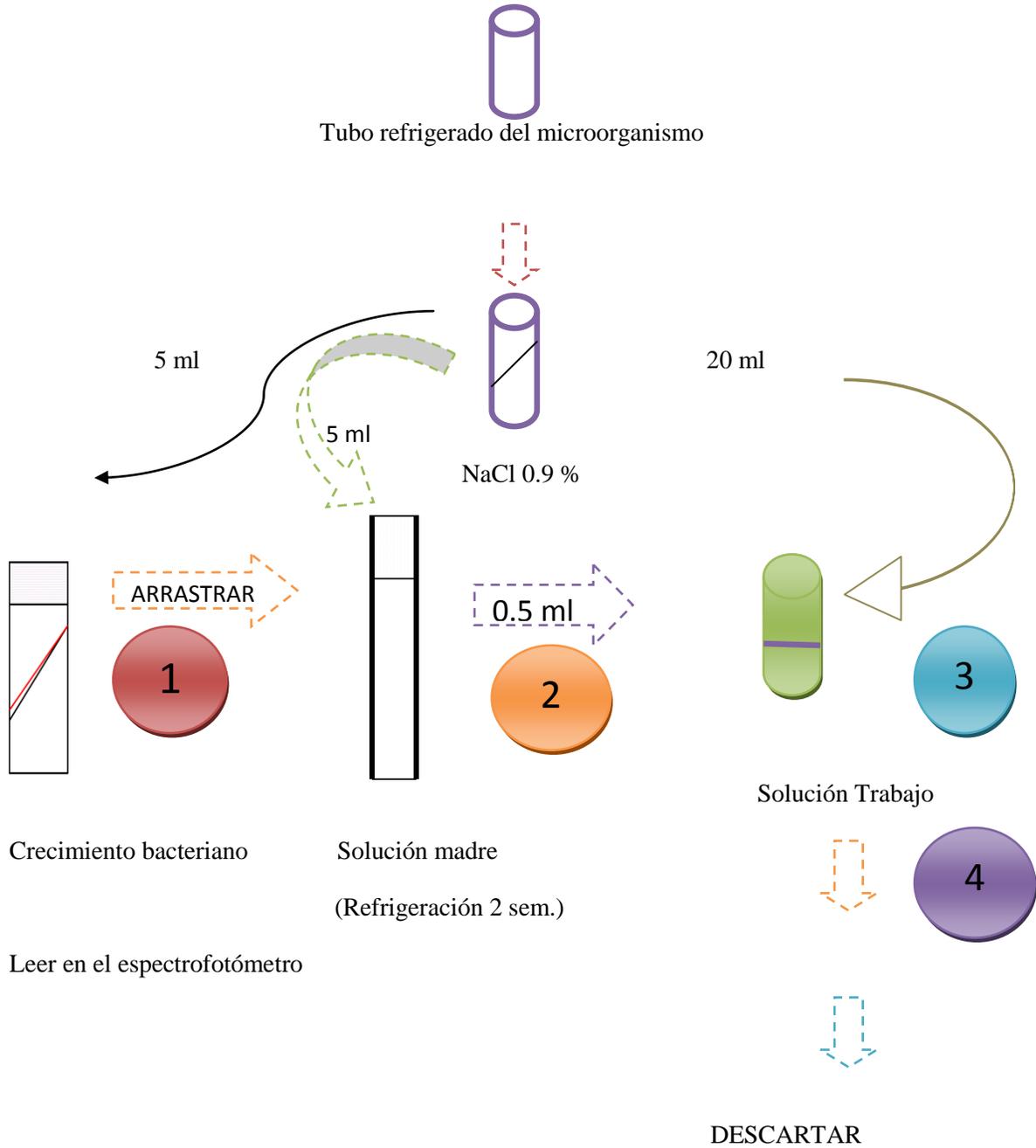
- Agregar 2 gotas de agua destilada a cada lado del porta objeto.
- Homogenizar la muestra con el agua y extender.
- Fijar el frotis.
- Adicionar por 1 minuto cristal violeta, lavar con agua.
- Luego solución de lugol por 1 minuto de manera que cubra todo el extendido.
- Lavar con agua.
- Adicionar por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



**LISTADO DE CEPAS ATCC SUGERIDAS PARA CONTROL DE CALIDAD
MICROBIOLOGICO**

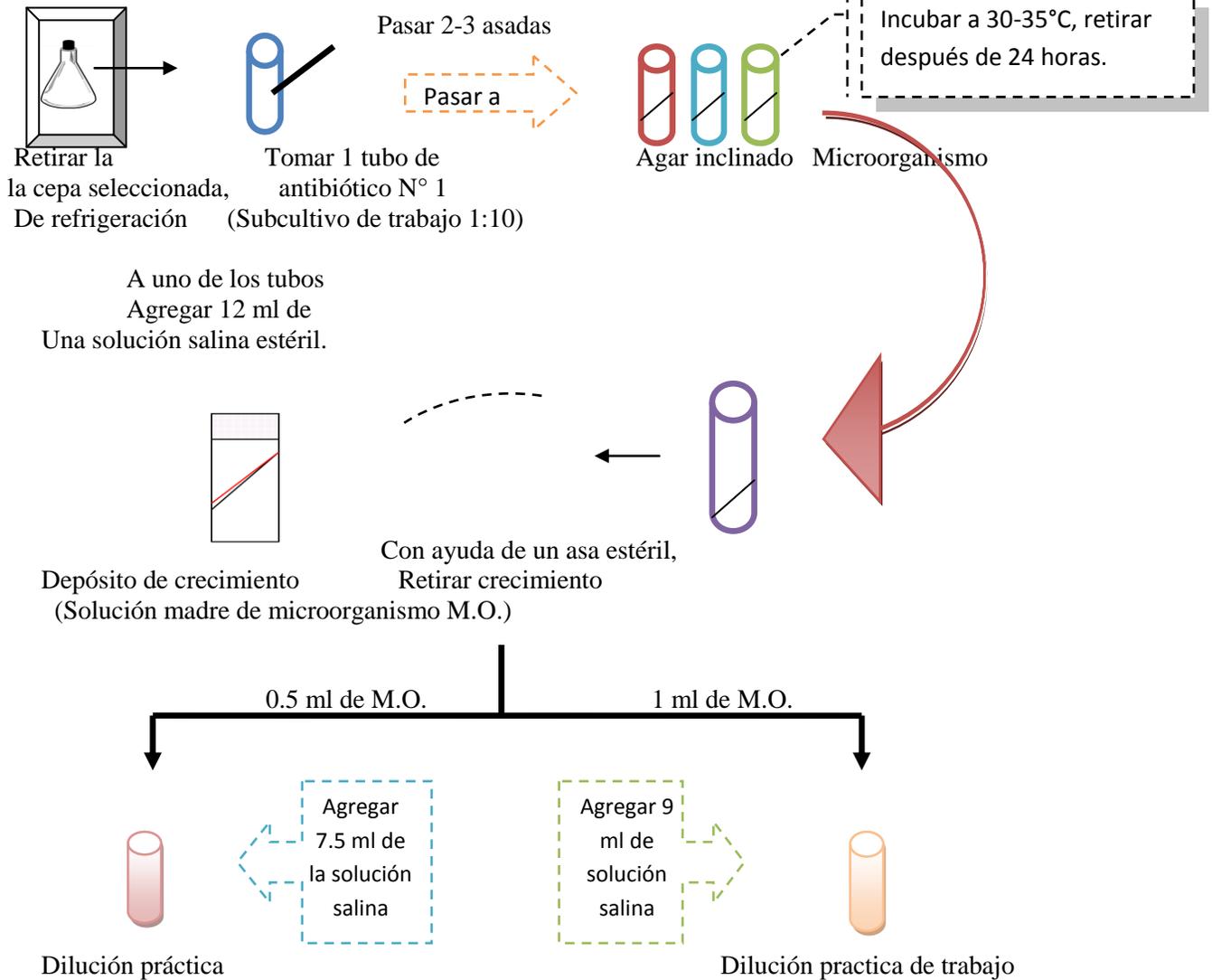
MICROORGANISMOS	ATCC
<i>Campylobacter jejuni</i>	33290
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Escherichia coli</i>	35218
<i>Proteus vulgaris</i>	8482
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	27853
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
<i>Shigella sonnei</i>	9290
<i>Shigella sonnei</i>	25911
<i>Shigella flexnerii</i>	12022
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
<i>Streptococcus faecalis</i>	19433
<i>Haemophilus influenzae</i>	49247
<i>Haemophilus influenzae</i>	49766
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49226
<i>Micrococcus Luteus</i>	9341
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	43894
<i>Bacteroides fragilis</i>	23745
<i>Clostridium perfringens</i>	3624
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404

Preparación de la suspensión del microorganismo para realizar Halos de Inhibición.

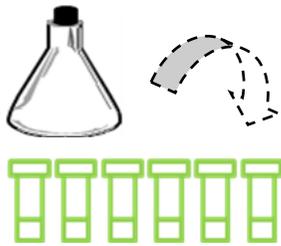


Preparación del inóculo del microorganismo de prueba.

☞ Preparación de la suspensión del microorganismo de prueba.



Esquema prueba de viabilidad de liofilizados.



10 % de los crioviales
Se agrega 1 ml de caldo nutritivo



Se siembran en platos e incuban por 24 hrs



Se comprueba el crecimiento en al menos 2 de 4 cuadrantes.

Lavado de cristalería nueva para prueba de potencia antimicrobiana.
(CNDR-MINSA CENTRAL)

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

Lavado de cristalería sucia.

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

Lavado de Cilindros de acero inoxidable para potencia:

1. Colocar los cilindros en un recipiente plástico y descontaminar en autoclave a 121 °C, por 20 minutos.
2. Proceder al lavado de los cilindros externa e internamente por sesiones repetidas de 3 veces con detergente y abundante agua potable, teniendo cuidado de no dañarlos.
3. Hervir los cilindros con agua destilada por 15 minutos.
4. Dejar enfriar un poco los cilindros, agregar 20 ml de Hidróxido de Sodio (10 N) y 10 ml de alcohol etílico al 90 %.
5. Hervir por 15 minutos y dejar reposar por 15 minutos.
6. Lavar nuevamente los cilindros enjuagando 6 veces con agua potable y 3 con agua destilada.
7. Hervir nuevamente los cilindros en agua destilada por 15 minutos.
8. Dejar enfriar.
9. Colocar los cilindros en platos Petri de vidrio estériles, cuidadosamente y haciendo uso de pinza estéril.
10. Someter a esterilización en autoclave 121 °C por 15 minutos antes de utilizar los cilindros nuevamente.

Esquema prueba de Pureza de Liofilizados.

Alícuota Cepa USP y/o Liofilizados



Se le agrega 1 ml de C. N



Incubar 24 a 37 °C



Paso a Medio Inclinado



Incuba 24 h a 37 °C



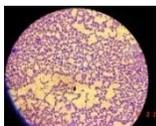
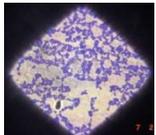
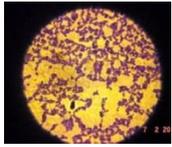
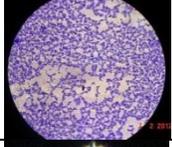
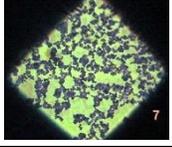
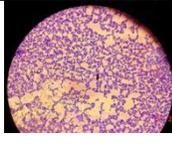
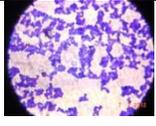
Tinción de Gram

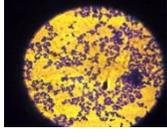
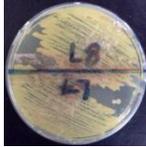
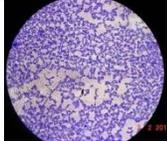
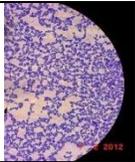


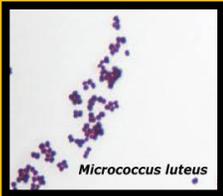
A. Sangre de Carnero

ANEXO No. 15

Resultados pruebas de Pureza y Viabilidad por lotes analizados:

No Lote	PUREZA				VIABILIDAD	
	Tinción de Gram	Imágenes	Caract.	Imágenes	Crecimiento (2/4 cuadrantes)	Imágenes
1	Cocos gram + agrupados en paquetes de 4 a más.		Crecimiento abundante de colonia de color amarillo fuerte.		4	
2	Cocos gram + agrupados en paquetes de 18, 20, 40...		Presencia de gran cantidad de colonias de color amarillo.		4	
3	Presencia de Cocos gram + en paquetes de 10- 30.		Crecimiento abundante de colonia de color amarillo fuerte.		4	
4	Cocos gram + en paquetes de 20-30-40.		Presencia de gran cantidad de colonias de color amarillo.		4	
5	Cocos gram + agrupados en paquetes de 2, 4, 6, 8, 10.		Crecimiento abundante de colonia de color amarillo fuerte.		4	
6	Cocos gram + agrupados en paquetes de 4 a más.		Presencia de gran cantidad de colonias de color amarillo.		4	
7	Cocos gram + en paquetes de 20-30-40.		Crecimiento abundante de colonia de color amarillo fuerte.		4	

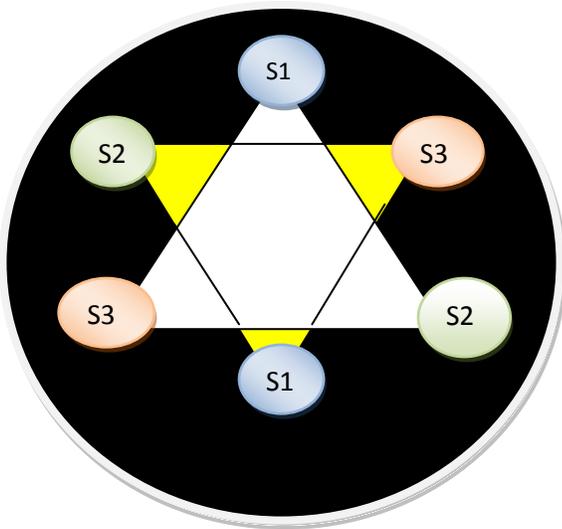
8	Cocos gram + agrupados en paquetes de 2, 4, 6, 8, 10.		Presencia de gran cantidad de colonias de color amarillo.		4	
9	Cocos gram + agrupados en paquetes de 18, 20, 40...		Crecimiento abundante de colonia de color amarillo fuerte.		4	
10	Cocos gram + agrupados en paquetes de 2, 4, 6, 8, 10.		Presencia de gran cantidad de colonias de color amarillo		4	

REFERENCIA	
PUREZA	VIABILIDAD
 	

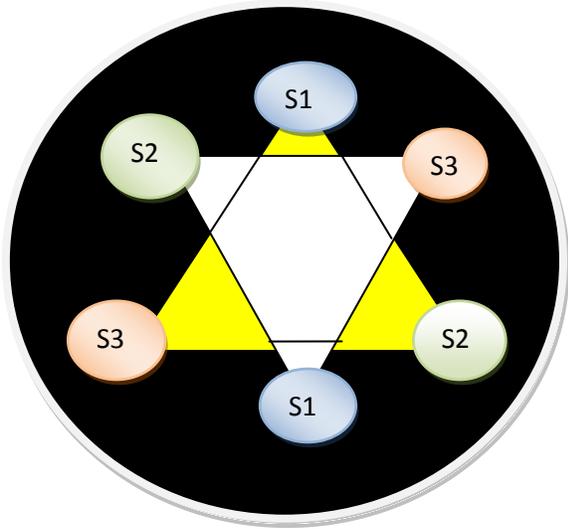
Resultados Estudio de Estabilidad acelerada de liofilizados.**ESTABILIDAD**

No. Vial	Viabilidad	Imágenes
1	4 Cuadrantes	
2	4 Cuadrantes	
3	4 Cuadrantes	
4	4 Cuadrantes	
5	4 Cuadrantes	
6	4 Cuadrantes	
7	4 Cuadrantes	

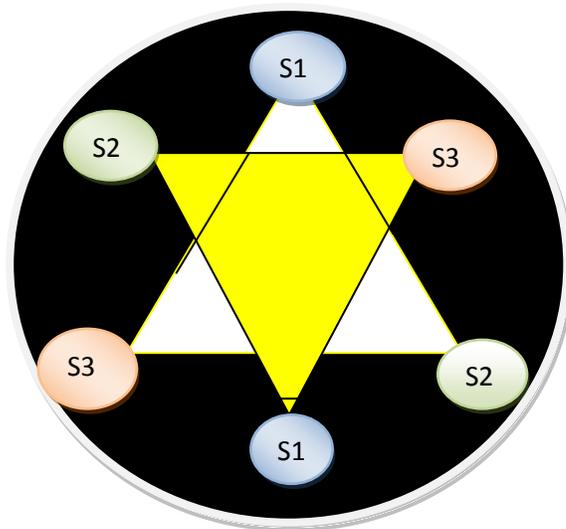
Lectura de Halos de Potencia:



Rotular placas
(Placas invertidas o hacia abajo)



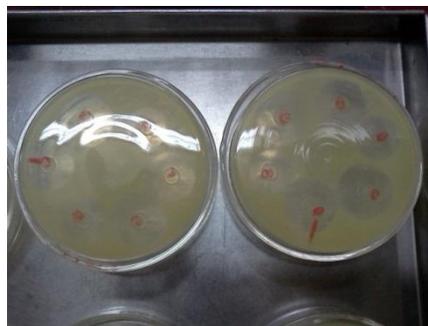
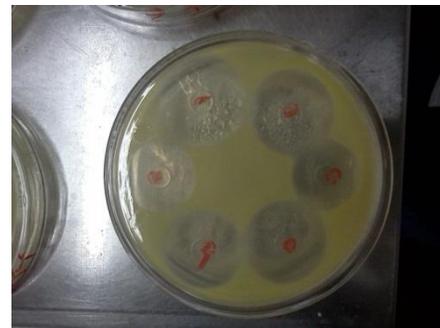
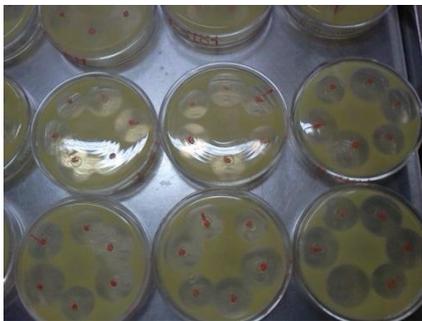
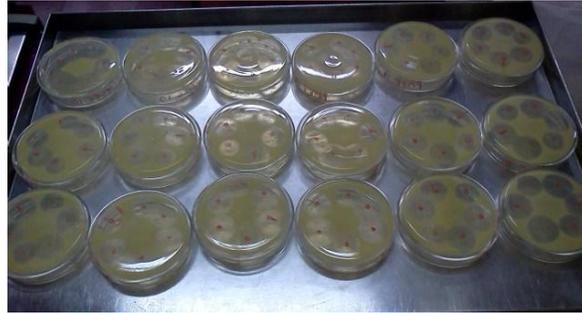
Llenado de cilindros
(Placas hacia arriba)



Lectura de Halos
(Placas hacia abajo o invertidas en el lector de zona)

ANEXO No. 18

Imágenes Resultados Obtención de Halos de Inhibición.



GLOSARIO

1. **Fenotipo:** En un organismo, manifestación externa de un conjunto de caracteres hereditarios que dependen tanto de los genes como del ambiente.
2. **Subcultivos:** Es una forma de mantener viable a un microorganismo por mucho tiempo y se puede hacer a temperatura ambiente o a la temperatura que se desarrolle el microorganismo. Consiste en tomar el organismo de un cultivo y llevarlo a un cultivo nuevo, después de días se vuelve a tomar de ese último cultivo a otro nuevo cultivo y así se repite una y otra vez para mantener viable a un organismo.
3. **Siembras:** reproducibilidad de condiciones de crecimiento y desarrollo de microorganismos, por medio del uso de sustratos nutritivos, a fin de observar la presencia, ausencia o comportamiento de determinados microorganismos.
4. **Incubar:** dejar los cultivos reposar en un tiempo pertinente y en condiciones determinantes para el crecimiento de los microorganismos.
5. **Pureza genética:** conjunto de individuos de identidad genética igual.
6. **Rehidratación:** es el proceso mediante el cual se agrega o adiciona líquido a un compuesto, a un organismo o a un objeto, que ha atravesado un proceso previo de deshidratación.
7. **Desnaturalización:** En bioquímica, la desnaturalización es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos de los organismos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.
8. **Contaminación microbiana:** presencia de microorganismos indeseados (en ocasiones de características patógenas) en una determinada muestra o producto.
9. **Proliferar:** multiplicación abundante del número o la cantidad de organismos de una muestra.
10. **Esterilización:** eliminación del número total de microorganismos de una superficie, solución, etc.