

SEGUNDO PATRON INTERNACIONAL PARA LA PENICILINA¹

Por J. H. HUMPHREY, M.D.,² M. V. MUSSETT, B. SCH.,² y
W. L. M. PERRY, M.D.³

En 1950, como se estaban agotando las existencias del Primer Patrón Internacional de Penicilina, el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS, en la tercera reunión celebrada en Ginebra (7), autorizó al Departamento de Patrones Biológicos del Instituto Nacional de Investigación Médica, de Londres, a elaborar una preparación adecuada de penicilina para el propuesto Segundo Patrón Internacional de Penicilina, y a establecer una valoración en colaboración internacional sobre la actividad del medicamento, de conformidad con las normas existentes.

Gracias a la generosidad de una firma británica, se obtuvieron 30 muestras de un solo lote de penicilina G sódica recristalizada especialmente. Este preparado se analizó por medio de un método microcromatográfico, estimándose que contenía 99.9% de penicilinas totales, que consistían en:

<i>Penicilina</i>	<i>Cantidad</i>
G	98.5%
F	1.0%
U6	0.2%
U1	0.1%
X	0.1%
D	0.1%
K	trazas

Antes de preparar las ampollitas, las preparaciones se sometieron a diversos procesos de valoración, obteniéndose las siguientes potencias provisionales: por valoración biológica en comparación con el primer Patrón Internacional, y por valoración yodométrica en comparación con 1,665 Unidades Internacionales (UI) por mg \pm 0.78%; patrón subsidiario cuidadosamente estandarizado, 1,657 UI/mg.

Se calculó que el contenido de humedad era menor de 0.2%. Al efectuarse la prueba de degradación acelerada no se determinó ninguna pérdida perceptible de potencia al calentar a 100°C durante cuatro días. En febrero de 1951 se colocó la preparación en ampollitas que ya habían

¹ Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 9, No. 1, 1953, p. 15.

² Departamento de Patrones Biológicos, Instituto Nacional de Investigación Médica, Londres.

³ Director, Departamento de Patrones Biológicos, Instituto Nacional de Investigación Médica, Londres; Miembro del Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la Organización Mundial de la Salud.

sido probadas, a razón de 25 mg en cada una. Esta operación se efectuó en una superficie esterilizada, a un 20% de humedad relativa. Las ampollitas se secaron sobre pentóxido de fósforo *in vacuo* a la temperatura ambiente durante 10 días, se llenaron con nitrógeno seco puro a presión atmosférica, y por último se sellaron. Desde entonces, todas las ampollitas se mantienen a una temperatura de -10°C .

Al mismo tiempo, se distribuyó en ampollitas otro envío del mismo material, el cual se utilizó posteriormente como Patrón Británico de Penicilina. A fin de determinar el número de unidades que se asignará provisionalmente al Patrón Británico, dos laboratorios del Reino Unido efectuaron la valoración de la potencia del patrón propuesto, asignándose, por medio de dichas pruebas, un conjunto de unidades de 1,675 UI/mg al Patrón Británico. Se aceptó, sin embargo, que esta cifra podía ser modificada más tarde como resultado de la valoración en colaboración internacional en gran escala que se requiere para designar este preparado como Patrón Internacional.

El Departamento de Patrones Biológicos ha redactado un memorándum para describir la preparación propuesta como Patrón Internacional y el tipo de valoración que se requiere, el cual se remitió a los 11 laboratorios de siete países que se habían comprometido a participar en la valoración en colaboración. Una copia de este memorándum aparece en el Anexo 1 del presente trabajo (véase la página 538); El Anexo 2 contiene una lista de los participantes y direcciones (véase la página 539). Los laboratorios que se mencionan en el informe se designarán por medio de un número y no por sus nombres respectivos.

MÉTODOS

Se solicitó a los laboratorios participantes que, siempre que fuera posible, realizaran la valoración utilizando por lo menos dos métodos. Se consideró que en esta forma se facilitaría la comparación de los resultados obtenidos con distintos métodos en cualquier laboratorio. No se sugirieron métodos específicos, ya que los procedimientos de valoración son tan variados y dependen a tal grado del equipo existente, que resultaría poco práctico cualquier intento para uniformarlos. Si un laboratorio usaba un mismo procedimiento pero con dos microorganismos distintos, se consideraban como dos procedimientos diferentes.

Se observaron muy pocos casos de similitud entre los detalles técnicos de los métodos utilizados por laboratorios distintos. En la gran mayoría de las valoraciones, sin embargo, se usaron distintas variaciones del método de placas de Petri y copas especiales; además, los dos microorganismos utilizados con mayor frecuencia fueron el *Staphylococcus aureus* y el *Bacillus subtilis*. Por lo tanto, para los fines del análisis comparativo se han considerado como un solo método todas las valoraciones efectuadas con placas de Petri y copas especiales en el microorganismo *S. aureus*.

CUADRO No. 1.—Resumen del número y tipo de valoraciones realizadas por los laboratorios participantes

Laboratorio No.	Número de valoraciones	Método empleado	Microorganismos empleados
1	8	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
	8	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
	8	Turbidimétrico	
2	4	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	8	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
	7	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
4	12	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
	12	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	8	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
	8	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
6	2	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
	3	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
	2	Turbidimétrico	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	2	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	1	Copa en placa	<i>Bacillus subtilis</i>
	1	Copa en placa	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
	1	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
9	3	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	1	Copa en placa	<i>Staphylococcus aureus</i>
	1	Dilución seriada	<i>Staphylococcus aureus</i>
11	12	Copa en placa	
Total...	112		

El Cuadro No. 1 muestra el número y los tipos de valoración realizados por los diferentes laboratorios participantes. Se consideró que cada serie de datos que permitía hacer un cálculo de la potencia era una valoración separada. Se observará que en conjunto, se han efectuado 112 valoraciones y que, de éstas, 101 son valoraciones por el procedimiento de placas de Petri y copas especiales, de las cuales 60 se realizaron con *S. aureus* y 40 con *B. subtilis*. Ha sido posible, pues, establecer una diferenciación entre los dos tipos principales de valoración para poder así comparar su eficacia.

En todos los casos se han usado procedimientos analíticos uniformes. La mayoría de las valoraciones se sometieron a un análisis de la variante, calculándose la actividad y los límites de error en la forma corriente. En un caso (Laboratorio 10) esto no se pudo realizar a causa del plan de valoración; en este laboratorio, la potencia media de cada valoración se calculó sobre la base del logaritmo medio de los estimados individuales de potencia, basados a su vez en aproximaciones gráficas, calculándose directamente la ponderación de la potencia media como la recíproca de la variante de la potencia media. En otro caso más (Laboratorio 7), una de las valoraciones se efectuó de conformidad con el método de la "curva estándar" valuándose el error sobre la base de la inclina-

ción de la curva estándar solamente, al no ser posible realizar una prueba de paralelismo sobre las líneas de la dosis y la reacción.

La combinación de los resultados de las distintas valoraciones se efectuó por un método aproximado (6) que había sido utilizado anteriormente en el análisis de las valoraciones en colaboración internacional del patrón de la digital (5), la sulfarsfenamina (1) y la insulina (4). La potencia media ponderada se obtiene por la siguiente ecuación:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

en la cual la W es la recíproca de la variante de cada estimado de potencia y los límites aproximados de error del factor \bar{M} se obtienen por la fórmula:

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}}$$

y en la cual:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{V(\bar{M})} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}}$$

Los límites de error obtenidos son más bien aproximados que fiduciarios exactos, aunque siempre que los estimados combinados de potencia sean homogéneos y que se recuerde que la aproximación tenderá a desestimar los límites, el método resulta satisfactorio en la práctica.

Las pruebas para determinar la homogeneidad de los estimados de potencia se hicieron por una prueba χ^2 , utilizando la relación aproximada

$$\chi^2 = \sum W(M - \bar{M})^2.$$

El número de grados de libertad es uno menos que el número de valoraciones.

RESULTADOS

Valoraciones por el método de placa y copa en *S. aureus*.—Se efectuaron sesenta valoraciones de este tipo, cuyos resultados aparecen resumidos en el Cuadro No. 2. Desgraciadamente, las 12 valoraciones efectuadas en el Laboratorio 11 han sido anuladas porque en la comparación del patrón propuesto no se utilizó el Patrón Internacional. El examen ha revelado que en dos laboratorios (Laboratorios 4 y 9) se obtuvo una heterogeneidad significativa en los estimados de potencia en el nivel $P = 0.01$ de probabilidad, y que en otro (Laboratorio 5) se obtuvo heterogeneidad significativa en el nivel $P = 0.05$ de probabilidad. En las valoraciones en colaboración realizadas en el pasado se aceptó que, si hay más de una probabilidad sobre cien de que los resultados sean homogéneos, esto se aceptaría como prueba de la ausencia significativa de la heterogeneidad. Sobre esta base fué posible aceptar los resultados del Laboratorio 5. En el caso del Laboratorio 9, sin embargo, los resultados de las tres valoraciones fueron sumamente distintos, pero como el total de ponderación de este laboratorio es pequeño y el medio de los tres

CUADRO No. 2.—*Resultado de las valoraciones por el método de copa en placa con el S. aureus*

Laboratorio No.	Número de valoraciones	Potencia media ponderada	Total de ponderación	Promedio de ponderación por valoración	Homogeneidad de los estimados de potencia	
					χ^2	P*
1	8	1,661	79,395	9,924	1.11	—
2	4	1,647	71,054	17,764	3.31	—
3	7	1,722	138,132	19,733	9.12	—
4	12	1,659	167,456	13,955	65.10	<0.001
5	8	1,658	330,285	41,286	17.15	<0.02
6	2	1,715	4,532	2,266	1.51	—
7	2	1,705	19,201	9,601	0.21	—
8	1	1,713	11,141	11,141	—	—
9	3	1,713	13,882	4,627	52.53	<0.001
10	1 (6†)	1,679	14,156	14,156	8.23	—
11	12	—	inválido	—	—	—
Total ..	60	—	849,234	14,154	—	—

* En este cuadro y en los siguientes sólo se incluye el valor de P cuando éste es menor de 0.05 (es decir, cuando hay prueba de heterogeneidad).

† Para estimar la potencia media ponderada de este laboratorio se emplearon varias estimaciones individuales por un método directo. Los resultados fueron analizados para dar 16 estimaciones de la potencia con su correspondiente ponderación, combiándose éstas para dar una sola estimación que puede ser considerada como una sola valoración. El valor de χ^2 , sin embargo, es una medida de la homogeneidad de 16 estimaciones de potencia y debe ser probado con 15 grados de libertad.

resultados es cercano al medio ponderado general, su inclusión tendrá muy poca influencia sobre la potencia media ponderada final. El caso del Laboratorio 4 es mucho más difícil. No obstante, se decidió no excluir los resultados por circunstancias que se discutirán más adelante.

La potencia media ponderada para todas las valoraciones efectuadas con este método es de 1,671 UI/mg y el peso total (ΣW) de este estimado es de 849,234. Esta cifra es una ponderación por exceso, toda vez que la homogeneidad entre laboratorios es muy insatisfactoria. La fórmula χ^2 es 36.99 con 9 grados de libertad. La probabilidad de obtener esta heterogeneidad por mera casualidad es menor de 1 por 1,000. Más adelante se considerarán las consecuencias de este hallazgo.

Valoraciones por el método de placa y copa en *B. subtilis*.—Se efectuaron cuarenta valoraciones de este tipo, cuyos resultados se resumen en el Cuadro No. 3. Todas las valoraciones son válidas; no hay prueba alguna de heterogeneidad en los cálculos obtenidos en ningún laboratorio, a excepción de los resultados sorprendentes del Laboratorio 4. Aquí, nuevamente, los estimados son significativamente heterogéneos. La combinación de todos los resultados da una potencia media ponderada de 1,680 UI/mg con una ponderación total de 636,967. Hay poca hetero-

CUADRO No. 3.—Resultados de las valoraciones por el método de copa en placa con el *B. subtilis*

Laboratorio No.	Número de valoraciones	Potencia media ponderada	Total de ponderación	Promedio de ponderación por valoración	Homogeneidad de los estimados de potencia	
					χ^2	P
1	8	1,673	124,956	15,620	2.39	—
3	8	1,658	177,514	22,189	6.75	—
4	12	1,697	86,400	7,200	40.32	0.001
5	8	1,693	232,282	29,035	5.05	—
6	3	1,717	6,784	2,261	0.22	—
8	1	1,728	9,031	9,031	—	—
Total...	40	—	636,967	15,924	—	—

geneidad entre los cálculos de potencia obtenidos en los diferentes laboratorios, correspondiendo a χ^2 la cifra de 12.71 sobre 5 grados de libertad, o sea una probabilidad de 0.02 a 0.05, nivel aceptable según las normas anteriores.

La potencia media obtenida por este procedimiento se comparó entonces con la potencia media obtenida por el procedimiento del *S. aureus*, encontrándose que no había diferencias significativas entre los dos ($\chi^2 = 2.36$ con un grado de libertad, esto es, $P > 0.1$). Este hallazgo es realmente sorprendente, en vista de la prueba procedente de otras fuentes. Se observó que los estimados de potencia obtenidos por todos los métodos en laboratorios individuales fueron muy heterogéneos (Cuadro No. 4). Sin embargo, como ya hemos visto (Cuadros Nos. 2 y 3), hay relativamente poca heterogeneidad entre los estimados obtenidos por un método en particular en los laboratorios individuales. Se ha sospechado, por lo tanto, que la heterogeneidad se debe a una

CUADRO No. 4.—Homogeneidad de los estimados de potencia según los laboratorios participantes individuales, por todos los métodos de valoración

Laboratorio No.	Número total de valoraciones por todos los métodos	Total de ponderaciones	Homogeneidad de los estimados de potencia	
			χ^2	P
1	24	1,708,949	66.65	<0.001
2	4	71,054	3.30	>0.3
3	15	315,646	36.84	<0.001
4	24	253,856	110.92	<0.001
5	16	562,567	33.36	<0.01
6	7	49,539	8.40	>0.2
7	2	19,201	0.21	>0.5
8	3	29,696	3.62	>0.1
9	3	13,882	52.53	<0.001
10	2 (32*)	39,189	11.42	>0.99

* Véase la nota al calce † en el Cuadro No. 2.

CUADRO No. 5.—Homogeneidad de los estimados de potencia segun los laboratorios participantes individuales, por métodos individuales de valoración

Laboratorio No.	Heterogeneidad de los estimados de potencia		
	Con el <i>Staphylococcus aureus</i>	Con el método del <i>Bacillus subtilis</i>	Con todas las valoraciones
1	—	—	+
2	—	—	—
3	—	—	+
4	+	+	+
5	—	—	+
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	+	—	+
10	—	—	—

+ = estimaciones heterogéneas
 — = estimaciones no heterogéneas } a $P > 0.99$ nivel de probabilidad.

diferencia inherente que existe entre los métodos, y esto es cierto cuando se considera por separado un laboratorio en particular (Cuadro No. 5). Es evidente que los estimados medios obtenidos por los métodos *S. aureus* y *B. subtilis* difieren significativamente en los Laboratorios 1, 3 y 5, o sea en los laboratorios que tuvieron una elevada ponderación total de las valoraciones. En los Laboratorios 1 y 5 el estimado de la potencia obtenido por el procedimiento *S. aureus* fué menor, y en el Laboratorio 3 fué mayor, que la potencia estimada por el procedimiento *B. subtilis*. La falta de discrepancia entre los dos estimados totales de estos dos métodos puede, por lo tanto, atribuirse solamente a que estas diferencias se cancelan cuando se combinan los resultados de todos los laboratorios.

Valoraciones por otros métodos.—En el Cuadro No. 4 se han combinado los resultados obtenidos en 12 valoraciones realizadas con otros métodos. Existe una heterogeneidad significativa entre los distintos estimados, pero como la única justificación para compararlos es la de la sencillez práctica, esta heterogeneidad puede, al menos, esperarse. La potencia media ponderada de estas 12 valoraciones es de 1,665 UI/mg y la ponderación total de 1,577,378.

Potencia de la media ponderada general.—En el Cuadro No. 7 se resumen los resultados obtenidos por diversos métodos. Al combinar estos resultados, se obtiene una potencia de la media ponderada general de 1,670.0 UI/mg con límites de error de 1,665.7 a 1,674.4, o de 99.7 % a 100.3 %.

DISCUSION

El interés principal que tienen estos resultados, aparte de que caracterizan el nuevo patrón propuesto, estriba en las diferencias observadas entre los estimados de potencia que se han obtenido por diferentes métodos y en distintos laboratorios.

Se sabe también que hay una contaminación de la substancia que se usa para el nuevo patrón por la penicilina F, que asciende al 1.0 %, y que se encuentran trazas de otras penicilinas. De modo que en teoría es lógico esperar que ocurran diferencias de potencia en las pruebas con diversos microorganismos. Es igualmente cierto, en cambio, que estas diferencias serían aparentes y significativas solamente si las valoraciones tuvieran un alto grado de precisión. Este último criterio se cumple ampliamente, con una ponderación total de tres millones para todas las valoraciones. Bajo tales condiciones, la más pequeña contravención de los supuestos que se deben cumplir para que la valoración sea válida (3), puede descubrirse fácilmente por la heterogeneidad de los estimados de potencia obtenidos por diversos procedimientos. El hecho de que esta heterogeneidad se pueda descubrir en varios casos entre los resultados obtenidos usando dos microorganismos diferentes, en un laboratorio, hubiera venido a apoyar la idea de que esta contaminación era significativa, aunque pequeña, si las discrepancias presentes en las potencias estimadas hubieran tenido la misma orientación. Como este no fué el caso, sin embargo, se hace sumamente difícil explicar esta heterogeneidad.

Sin embargo, para la caracterización de este nuevo patrón es verdaderamente afortunado que estas diferencias se cancelen mutuamente al reunir todos los resultados, de modo que el medio de potencia obtenido por un método no difiere significativamente del obtenido por otros. Sobre esta base, hemos justificado el uso del medio ponderado como estimado válido de potencia.

Cuando consideramos la heterogeneidad de los estimados en un laboratorio determinado por el mismo método, nos sentimos, sin embargo, en un terreno menos firme. Esta heterogeneidad fué especialmente marcada en el caso del Laboratorio 4, donde fué altamente significativa tanto con el *S. aureus* como con el *B. subtilis*. Aquí surge el problema de los límites de error de una sola determinación, los que se consideran menores de lo indicado por la reproductibilidad de las determinaciones sucesivas. Si esto lo atribuimos a la contaminación de la substancia estándar con otras penicilinas, entonces tenemos que suponer que el efecto de estos contaminantes tiene alguna interacción con el efecto de los cambios de técnica o del tiempo transcurrido entre valoraciones del mismo tipo, o tal vez que existe una falla en el plan o en la técnica de la valoración que tiende a desestimar los verdaderos límites de error; o que la substancia contenida en las ampollitas no es homogénea. Por estas razones, se llegó a dudar de la conveniencia de incluir los resultados del Laboratorio 4 en el estimado general de la potencia del medicamento. El estimado medio de la potencia obtenido en todas las valoraciones del Laboratorio 4 (1,672 UI/mg) era, sin embargo, casi igual al total de ponderación de la potencia media de 1,670 UI/mg, considerándose entonces que la supresión de estos resultados en particular, no alteraría perceptiblemente el estimado final. Así pues, se decidió incluir estos

resultados. Exactamente lo mismo sucedió con los resultados de las valoraciones turbidimétricas efectuadas en el Laboratorio 1. En este caso, la potencia media fué de 1,667 UI/mg y, a pesar de la heterogeneidad (Cuadro No. 6), se incluyeron estos resultados al calcular el total de ponderación de la potencia media.

CUADRO NO. 6.—*Resultado de las valoraciones por otros métodos*

Laboratorio No.	Método	Número de valoraciones	Potencia media ponderada	Total de ponderación	Promedio de ponderación por valoración	Homogeneidad de los estimados de potencia	
						χ^2	P
1	Turbidimétrico	8	1,667	1,504,598	188,075	62.64	<0.001
6	Turbidimétrico	2	1,612	38,223	19,112	0.14	—
8	Placa (<i>Neisseria gonorrhoea</i>)	1	1,630	9,524	9,524	—	—
10	Dilución en serie	1	1,676	25,033	25,033	—	—
Total...	—	12	—	1,577,378	131,448	—	—

Es interesante observar cómo el promedio de ponderación aportado por cada valoración del *S. aureus* es aproximadamente igual al promedio de ponderación aportado por cada valoración del *B. subtilis*, de modo que, en este caso, es muy difícil escoger entre los dos microorganismos de prueba. Esta comparación es válida por cuanto cada laboratorio realizó aproximadamente el mismo número de valoraciones por cada método; de modo que, aunque el tamaño de la valoración varió grandemente de laboratorio a laboratorio, las discrepancias del tamaño no afectan en mucho la comparación de las ponderaciones medias.

Otro punto interesante de estas valoraciones es la ponderación total extremadamente grande unida a la potencia media total ponderada; es decir, unos tres millones. Esta valoración en colaboración debe ser una de las más precisas que jamás se han realizado y los límites de error obtenidos finalmente, aunque pueden ser desestimados en $\pm 0.3\%$, son tan pequeños que sencillamente hay que comentarlos. Es cierto que, haciendo toda clase de concesiones a la desestimación de los límites verdaderos, se ha podido determinar efectivamente la potencia del nuevo patrón con un error menor de $\pm 1\%$, grado de exactitud casi imposible de obtener en la mayoría de las valoraciones biológicas. Para comprobar la veracidad de tal cosa mencionaremos los siguientes hechos. Si llegamos a la conclusión de que, debido a la heterogeneidad significativa de los estimados de potencia, la combinación de los estimados por medio del cómputo de la ponderación media se encuentra completamente injustificada, existe otro procedimiento a seguir para llegar a un estimado final de la potencia que consiste en el uso del medio geométrico no ponderado de los estimados, o sea el medio aritmético de todos los estimados de potencia, calculando el error por medio del cálculo directo

del error estándar del medio. Una vez que se haya practicado esta operación, se observará que:

$$\begin{aligned} \text{potencia media no ponderada} &= 1675.6 \text{ UI/mg} \\ \text{límites de error (P = 0.05)} &= 1,662.5-1,688.9 \text{ UI/mg (es} \\ &\text{decir, 99.2\% a 100.8\%)} \end{aligned}$$

De modo que, aun sobre esta base directa, el error de la potencia media es menor del 1 % y su amplitud incluye la potencia media ponderada.

Cuando existe una heterogeneidad significativa entre los estimados de potencia, que se atribuye a la estimación por exceso de las ponderaciones de los estimados individuales, y no a impurezas que hay en el patrón, el otro procedimiento a emplear consiste en la corrección de las ponderaciones de los estimados dividiendo el "factor de heterogeneidad" (χ^2 grados de libertad). Esta corrección se realizó en aquellos grupos de valoraciones (Cuadros Nos. 2, 3 y 4) en que había heterogeneidad significativa, y se hizo otra corrección más en la combinación de valoraciones por métodos diferentes (Cuadro No. 7). Esta corrección reduce enorme-

CUADRO NO. 7.—Resumen de resultados medios por distintos métodos de valoración y estimación de la potencia media ponderada total

Método de valoración	Número de valoraciones válidas	Potencia media ponderada	Ponderación total	Homogeneidad de los estimados de potencia	
				χ^2	P
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	1,671	849,234	195.38	<0.001
<i>Bacillus subtilis</i>	40	1,680	636,967	67.32	<0.005
Otros.....	12	1,665	1,577,378	70.70	<0.001
Total.....	100	1,670	3,063,579	—	—

$M = 0.22272$, es decir, potencia = 1,670 UI/mg.

$$V(\bar{M}) = \frac{1}{\sum W} = 0.0000003264156$$

$$\frac{s}{\bar{M}} = 0.0005713$$

Logaritmo aproximado de límites de error (P = 0.05) = $\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} = 0.22272 \pm 0.00112 = 0.22160$ a 0.22384 .

es decir, límites de error (P = 0.05) = 1,665.7 - 1,674.4 UI/mg, ó 99.7 a 100.3%.

mente la ponderación total unida a la ponderación final de la potencia media, que es entonces de 964,766 en vez de 3,063,579, con nuevos estimados de potencia media ponderada en la forma siguiente:

$$\begin{aligned} \text{potencia media ponderada} &= 1,673 \text{ UI/mg} \\ \text{límites de error (P = 0.05)} &= 1,665.6-1,681.0 \text{ UI/mg (es} \\ &\text{decir, de 99.5\% a 100.5\%)} \end{aligned}$$

Con esta corrección se ha logrado que la potencia media ponderada tenga mayor similitud con la media no ponderada. Además, los límites de error corregidos aun quedan en $\pm 1\%$.

Sin embargo, como son tan pequeñas las diferencias que existen entre los tres estimados finales, y habida cuenta de que la heterogeneidad con toda probabilidad se debe al contenido en el patrón de 1.5% de penicilinas que no son penicilina G, hemos adoptado el total de ponderación de la potencia media como el mejor de los estimados disponibles y, sobre esta base, hemos asignado las unidades para el nuevo Patrón Internacional de la Penicilina.

Para terminar, se pueden hacer varias observaciones referentes a la pureza y estabilidad del Primer Patrón Internacional de la Penicilina establecido en 1945. Esta substancia era una mezcla de 10 muestras enviadas por diferentes laboratorios que, una vez recristalizada, se consideró que en aquel momento era la muestra más pura de penicilina G sódica que se podía obtener. Se le asignó una potencia de 1,667 UI/mg. El hecho de que al cabo de siete años se haya encontrado que una muestra recientemente preparada, con un alto grado de pureza, tenga una potencia de 1,670 UI/mg, es decir, una diferencia de tan sólo 0.18%, muy bien puede tomarse como un homenaje a la pureza y estabilidad del Primer Patrón.

DEFINICIÓN DE LA NUEVA UNIDAD INTERNACIONAL

El Segundo Patrón Internacional de la Penicilina ha sido valorado según los términos del Primer Patrón Internacional, estimándose que contiene 1,670 UI/mg con límites de error ($P = 0.05$) de 1,666 a 1,674 UI/mg. Se modifica, por ende, la definición de la Unidad Internacional de Penicilina, la cual queda por la presente definida como la actividad contenida en 0.0005988 mg del Segundo Patrón Internacional de la Penicilina.

ANEXO 1

MEMORANDUM ENVIADO A LOS PARTICIPANTES EN LA VALORACION EN COLABORACION INTERNACIONAL DEL SEGUNDO PATRON INTERNACIONAL PROPUESTO PARA LA PENICILINA

Se sugiere que cada laboratorio participante realice no menos de cuatro valoraciones biológicas; de preferencia dos por un método y dos por otro método. Siempre que sea posible se deben emplear dos métodos, pero solamente cuando los trabajadores se hallen relativamente familiarizados con ambos, a fin de que se pueda medir la variación entre los métodos empleados en un laboratorio. Cualquier método de valoración reconocido es apropiado, siempre y cuando se observen los siguientes puntos:

- (1) La relación dosis-respuesta es lineal. En los casos en que esto ya se ha confirmado, sólo hay que probar dos dosis-niveles del patrón y de la incógnita. Cuando no se dispone de la prueba necesaria, el plan de la valoración misma debe efectuarse de tal manera que proporcione prueba del carácter lineal, en otras palabras, deben probarse no menos de tres dosis-niveles del patrón y de la incógnita.

(2) En todos los casos, la valoración se debe realizar en tal forma que proporcione, de su propia prueba interna, un estimado de la potencia de la incógnita en los mismos términos que el patrón, así como límites fiduciarios de ese estimado. Esto impone que la prueba se efectúe en no menos de dos dosis-niveles del patrón y de la incógnita.

(3) El plan debe ser preparado en forma tal que asegure la eliminación de los factores que se sabe producen la variación en aquellos casos en que esos factores no pueden ser controlados adecuadamente por otros medios. Las modificaciones serán distintas en cada tipo de valoración, llamándose la atención sobre los siguientes factores:

- (a) la variación entre los operarios;
- (b) errores al pesar y al diluir (conviene pesar dos veces);
- (c) el tiempo que toma llenar las cuentas o copas.

Los participantes no tienen que hacer un análisis estadístico. Los resultados se deben enviar al Departamento de Patrones Biológicos, Instituto Nacional de Investigación Médica, Mill Hill, Londres, N. W. 7 en la forma original, donde se efectuará el análisis general.

DETALLES DE PREPARACIÓN

Cada laboratorio participante contará con tres frascos del nuevo Patrón Internacional propuesto y tres del actual Patrón Internacional de la Penicilina de 25 mg aproximadamente cada uno. El contenido de todos los frascos se secó sobre pentóxido de fósforo, llenándose luego con nitrógeno puro seco antes de sellarlos. La potencia está expresada en los términos del verdadero contenido de los frascos sin ulterior desecación. Por esta razón, aunque los compuestos no son inusualmente higroscópicos, el peso se debe determinar con un mínimo de exposición a la humedad atmosférica.

La potencia del Patrón Internacional es de 1,667 UI de actividad específica de la penicilina por mg.

Se espera que, de desear usted participar en la valoración, podrá remitir los resultados, en su forma original, a más tardar el 31 de julio de 1951. Los resultados y el análisis de los mismos se someterán a los participantes para cualesquiera comentarios que deseen hacer, y se espera que el informe final esté listo para la próxima reunión del Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS, que ha de tener lugar en 1951.

ANEXO 2

LABORATORIOS PARTICIPANTES EN LA VALORACION EN COLABORACION

Bélgica	Dr. P. Nélis, Dr. A. Lafontaine, Sra. de Maeyer-Cleempoel y Dr. Massa Laboratoire Central d'Hygiène Ministère de la Santé Publique et de la Famille 2, Parc du Cinquantaenaire Bruselas
---------	---

- Canadá
Dr. J. Gibbard
Laboratory of Hygiene
Department of National Health and Welfare
Ottawa, Ontario
- Dinamarca
Dr. J. Ørskov, Dr. N. K. Jerne y Dr. J. Bang
Statens Seruminstitut
Amager Boulevard 80
Copenhague
Dr. C. Treschow
Leo Pharmaceutical Products
Brønshøjvej 19
Copenhague
- Estados Unidos
Dr. H. Welch y Dr. D. C. Grove
Division of Antibiotics
Federal Security Agency
Food and Drug Administration
Washington 25, D. C.
Dr. F. H. Hedger, Dr. J. A. Means y Sr. R. J. Kersey
Analytical Department
Chas. Pfizer y Cía., Inc.
11 Bartlett Street
Brooklyn 6, N. Y.
Dr. W. E. Gaunt
Quality Control Division
Messrs. E. R. Squibb e Hijos
Biological and Chemical Laboratories
New Brunswick, N. J.
- Italia
Prof. E. Chain y Dr. L. Silvestri
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Margherita
Roma
- Países Bajos
Dr. H. van Genderen y Dr. A. Manten
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid
Sterrenbos 1
Utrecht
- Reino Unido
Sr. G. F. Hall, Sr. G. Sykes y Sr. D. G. Lewis
Standards Department
Boots Pure Drug Co. Ltd.
Station St.
Nottingham
Sr. C. R. Bond, Srta. H. P. Lee y Srta. B. K. Ormrod
Imperial Chemical Industries Ltd.
British Alizarine Works
Manchester 17
Dr. J. H. Humphrey y Sr. J. W. Lightbown
Department of Biological Standards
National Institute for Medical Research
Mill Hill, Londres, N.W. 7

SUMARIO

En 1950, el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS autorizó al Departamento de Patrones Biológicos del Instituto Nacional de Investigación Médica de Londres a preparar un Segundo Patrón Internacional de Penicilina. Un lote único de penicilina G sódica especialmente recristalizada fué sometido a una valoración comparada en la cual participaron 11 laboratorios de siete países. Se efectuaron 112 valoraciones por el método de copa en placa, utilizando *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Los resultados de las valoraciones sometidas a métodos estándar de análisis estadístico conducen a las siguientes conclusiones: el Segundo Patrón Internacional de Penicilina contiene 1,670 UI/mg, con límites de error ($P = 0.05$) de 1,666 a 1,674 UI/mg. La nueva unidad queda, pues, definida como la actividad contenida en 0.0005988 mg del Segundo Patrón Internacional de Penicilina.

REFERENCIAS

- (1) Davies, M. G., Miles, A. A., y Perry, W. L. M., *Bull. World Health Org.*, 4:563, 1951.
- (2) Fisher, R. A.: "Statistical methods for research workers," 3ª ed., Londres y Edinburgo, 1930.
- (3) Jerne, N. K., y Wood, E. C.: *Biometrics*, 5:273, 1949.
- (4) Miles, A. A., Mussett, M. V., y Perry, W. L. M.: *Bull. World Health Org.* 7:455, 1953.
- (5) Miles, A. A., y Perry, W. L. M.: *Bull. World Health Org.*, 2:655, 1950.
- (6) Perry, W. L. M.: Spec. Rep. Ser. Med. Coun. Lond. No. 270, 1950.
- (7) World Health Organization: Expert Committee on Biological Standardization, World Health Org. Techn. Rep. Ser. 2, 1950.

THE SECOND INTERNATIONAL STANDARD FOR PENICILLIN

(Summary)

In 1950 the Department of Biological Standards, National Institute for Medical Research, London, was authorized by the WHO Expert Committee on Biological Standardization to prepare the Second International Standard for Penicillin. A single batch of specially recrystallized sodium penicillin G was obtained and 11 laboratories in seven different countries were requested to take part in its collaborative assay. 112 essays were carried out, of which 101 were done by cup-plate methods using either *Staphylococcus aureus* or *Bacillus subtilis*. The results were subjected to standard methods of analysis, on the basis of which the authors define the Second International Standard for Penicillin as containing 1,670 International Units (IU) per mg, with limits of error ($P = 0.05$) of 1,666–1,674 IU/mg. The International Unit is therefore redefined as the activity contained in 0.0005988 mg of the Second International Standard for Penicillin.