

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE FARMACIA**



**MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
FARMACIA Y QUIMICA**

**" VALIDACIÓN DEL MÉTODO DILUCIÓN NEUTRALIZACIÓN (AFNOR NF
T 72-150) PARA DETERMINAR LA EFICACIA BACTERICIDA DE
TRICLOSAN AL 0.3 %.**

**AUTORES: BR. MARBELLY DE LOS ANGELES ALVARADO LUGO.
BR. CLAUDIA LEONOR BACA RUEDA.**

TUTOR: LIC. KELVIN NUÑEZ.

ASESORIA: LIC. MARÍA PATRICIA BACA SOLIS.

León – Nicaragua Abril 2004



AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios y a la virgen Santísima por darme fortaleza y sabiduría para poder cumplir uno de mis preciadas metas, culminar mis estudios universitarios.

A mi madre Antonia Lugo, por alentarme y brindarme su apoyo incondicional y dedicación durante los cinco años de carrera.

A mi abuelita María Lacayo, por enseñarme que lo principal por cumplir con nuestras metas es tener paciencia y ser tolerante.

A mi tía Martha, por ofrecerme su apoyo incondicional.

Al personal del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos:

Lic. Patricia Baca.

Lic. Mirna Mendoza.

Lic. Santiago Mejía.

Y en especial a la Licenciada Nubia Blanco, por brindarnos su valiosa ayuda durante la realización de nuestro trabajo monográfico.

Y a todas las personal que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este estudio.

Marbelly de los Angeles Alvarado Lugo.



AGRADECIMIENTO

Mi mayor agradecimiento es a Dios nuestro Señor y a la Virgen Santísima que siempre me brindaron valor, fortaleza, sabiduría y compañía porque siempre me colocaron en mi camino personas que me brindaron su apoyo y cariño imprescindible para que yo pudiera llegar a esta meta que un día era un sueño más.

Igualmente merecen mi agradecimiento a mi Mamá Gioconda Rueda, mis hermanos Pedro Gustavo Baca, Ihara Baca, a mis abuelitas, tías y primos (as), que siempre me dieron su apoyo y ayuda a medida de lo posible.

Especialmente agradezco a la familia González Baca por haberme cuidado como un miembro más en su hogar, durante 4 años compartiendo tropiezos y alegrías.

Cabe mencionar que el presente Trabajo Monográfico fue asesorado y realizado la parte práctica en Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos (MINSA) por lo que agradezco a la Lic. Nubia Blanco Sampson, Lic. Mirna Mendoza, Lic. Santiago Mejía y de manera especial a la Lic. Patricia Baca por habernos permitido aprender y compartir sus conocimientos y experiencia.

Claudia Leonor Baca Rueda.



INDICE

OBJETIVO GENERAL	1
OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
INTRODUCCION	3
MARCO TEORICO	4
HIPOTESIS	19
MATERIAL Y METODO	20
ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	40
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFIA	67
ANEXOS	69
GLOSARIO	86



OBJETIVO GENERAL

*Validar el método Dilución-Neutralización (AFNOR NFT 72-150), para determinar la eficacia bactericida del Triclosan al 0.3%.



OBJETIVOS ESPECIFICOS

- *Validar los medios de cultivos utilizados en el ensayo.
- *Caracterizar las cepas control utilizadas.
- *Seleccionar el agente neutralizante para el desinfectante a ensayar.
- * Determinar los parámetros de validez del método.



INTRODUCCION

La calidad de los productos es medible y se puede comparar las calidades de los productos manufacturados por distintas empresas o las calidades de partidas o lotes de un producto producidos por una misma empresa.

En nuestro país se carece de metodología respaldada por estudios de validez para determinar la eficacia de desinfectantes y antisépticos. Actualmente el método que se utiliza para controlar la calidad de los mismos es el Límite Microbiano, el cual no garantiza su eficacia, por lo que el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamento, consiente del problema evaluó diferentes técnicas que presentaron como principal inconvenientes ser de carácter cualitativo.

Es bien conocido que el personal involucrado en procesos de producción de medicamentos y áreas clínicas muchas veces son los principales portadores que desencadenan procesos de contaminación.

Así considerando que los desinfectantes y antisépticos son sustancias químicas destinadas a eliminar o inhibir a gran cantidad de microorganismos, se hace necesario determinar la eficacia de los mismos, mediante una técnica cuali-cuantitativa que hace evidente la importancia de nuestro estudio.



MARCO TEORICO



VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos de análisis, permiten realizar sistemáticamente los ensayos y obtener resultados válidos del proceso analítico. La validación de un método analítico permite conseguir objetivos técnicos y al mismo tiempo exigencias legales en la industria farmacéutica; el disponer de métodos analíticos que garanticen la fiabilidad de los resultados es el deseo permanente de todo analista responsable, y actualmente ya es también una exigencia legal. Por lo tanto, desde un punto de vista meramente económico –por el alto costo que implican las repeticiones- como desde el punto de vista científico, la aplicación de un método analítico que brinde a la primera resultados incuestionables es, sin lugar duda, un reto científico-técnico.

VALIDACIÓN: es obtener evidencia documental que permita demostrar que un procedimiento o proceso producen resultados consistentes a lo largo de su aplicación, de acuerdo con su diseño. Es decir, evidenciar que el método de análisis o el proceso productivo hace exactamente aquello para lo que ha sido diseñado. Para conseguirlo la condición necesaria es el conocimiento técnico de las características de dicho método o proceso.

La validación es un proceso que debe producir evidencia documentada de:

- Aptitud de los materiales,
- Buen funcionamiento y confiabilidad del equipo,
- Adecuación de los sistemas de preparación y conservación de las instalaciones,
- Competencia del personal,



Todos estos factores deben proporcionar resultados seguros y confiables, disponiendo además de la interpretación adecuada de los datos recogidos en suficiente número de ensayos para obtener una medida estadística válida.

Con el propósito de asegurar la calidad del producto obtenido, cada uno de los procesos involucrados debe ser válido aplicando las buenas prácticas de validación, para el cual se requiere del establecimiento de procedimientos operativos estandarizados (POES) o protocolos.

El proceso de validación de métodos de análisis de laboratorio consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, así como la evidencia documentada del procedimiento, el diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y un criterio de aceptación.

La validación del método para el análisis de una muestra o para el seguimiento de un proceso particular no garantiza que el método puede utilizarse indiscriminadamente para cualquier clase de muestra o proceso. Su aplicación permite obtener información estadísticamente confiable, lo cual constituye una evidencia para tomar decisiones respecto a la adecuación de una operación o procedimiento dentro del proceso que se valida.



En microbiología los parámetros que se evalúan son: **Exactitud y Precisión.**

Para evaluar cada uno de estos parámetros se debe de realizar el proceso de validez de una forma exigente y rigurosa y se deberá definir de manera clara y precisa el procedimiento a seguir, el análisis estadístico y los criterios de aceptación.

PRECISIÓN: es el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogéneas. La precisión esta relacionada con la dispersión de las medidas de su valor promedio o central. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación (RSD ó CV), permitiendo ambos estimadores, evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida de error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad (diferente analista, diferente día, diferente instrumento) y/o repetibilidad (mismo analista, mismo día, mismo instrumento), del método analítico bajo las condiciones normales.

REPETIBILIDAD: es el grado de concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones: analista, aparato, laboratorio, tiempo, etc.).



PRECISIÓN: es la medida del error.

El siguiente procedimiento es aplicable únicamente cuando se utilizan 2 días diferentes, 2 analistas diferentes y 3 determinaciones:

1- Tabular los resultados con base al siguiente formato.

TABLA 1

DIA	ANALISTAS	
	1	2
1	Y_{111}	Y_{211}
	Y_{112}	Y_{212}
	Y_{113}	Y_{213}
2	Y_{121}	Y_{221}
	Y_{122}	Y_{222}
	Y_{123}	Y_{223}

2- CÁLCULOS PRELIMINARES.

$$Y. . . = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}.$$

$$\sum Y^2 = Y_{111}^2 + Y_{112}^2 + Y_{113}^2 + Y_{211}^2 + Y_{212}^2 + Y_{213}^2 + Y_{121}^2 + Y_{122}^2 + Y_{123}^2 + Y_{221}^2 + Y_{222}^2 + Y_{223}^2.$$

$$\underline{Y} = Y. . . / N$$

$$DE = [N (\sum Y)^2 - (Y. . .)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$

N= número total de determinaciones (en este caso específico N=12).

CRITERIOS: El CV total debe cumplir con el siguiente formato.



TABLA 2

MÉTODO	C.V
Microbiológicos	$\leq \% 5$

REPRODUCIBILIDAD: es el grado de concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones independientes. Para el caso particular del análisis de dos analistas en dos diferentes días y con tres replicaciones cada uno, se realiza el análisis de varianza que se describe a continuación: Ejemplo del modelo

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + \epsilon_{k(ij)}$$

Donde:

y_{ijk} = El ensayo de sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el i ésimo analista en el j ésimo día.

μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = Efecto del analista en el ensayo.

$\delta_j(i)$ = Efecto del día anidado en el analista.

$\epsilon_{k(ij)}$ = Error del método analista.

a = Número de analistas.

d = Número de días.

r = Número de replicas.

1- Tabular los resultados (Ver tabla 1).



CÁLCULOS PRELIMINARES

1-Calcular la suma de las combinaciones analista-día. (y_{ij}):

$$y_{11} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

2-Calcular la suma para cada analista (y_i).

$$y_1 = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_2 = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

3-Calcular la suma total (y).

$$y = y_1 + y_2$$

4-Calcular la suma del cuadrado de cada analista de cada día.

$$\sum \sum y_{ij}^2 = (y_{11})^2 + (y_{12})^2 + (y_{22})^2$$

5-Calcular la suma del cuadrado de cada analista en los dos días.

$$(\sum y_i)^2 = (y_1)^2 + (y_2)^2$$

6-Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado.

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

7-Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista.

$$SCa = \sum y_i^2 / r - y^2 / adr$$

8-Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd).

$$SCd = \sum \sum y_{ij}^2 / r - \sum y_i^2 / dr$$



9- Calcular la suma de cuadrados del error (SCe).

$$SCe = \sum \sum y_{ijk}^2 - \sum y_{ij}^2 / r$$

CALCULOS FINALES

1- Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de la varianza (ANADEVA):

TABLA 3

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fcal	F0.05*
<u>Analista</u> (α)	gla= a – 1	Sca	Mca=Sca gla	Fa=Mca MCd	Fgla/ gld
<u>Día</u> (δ)	gld=(d-1)a	SCd	MCd=SCd gld	Fa=MCd Mce	Fgld/ gle
<u>Error</u> (ε)	gle=(r-1)ad	Sce	Mce=Sce gle	_____	_____

F0.05*= Los valores de F0.05 se obtienen de la tabla F de Fisher, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador verticalmente, para un $\alpha = 0.05$.

2- Realizar la interpretación de los resultados.

Si $F_a < F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d \geq F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.



Si el método no es reproducible por los analistas y/o entre días para un mismo analista, la variación en el método analítico para estos se calcula con las siguientes ecuaciones:

Variación internacionalista: $\pm [Mca - MCd / rd]^{1/2}$

Variación interdías para analista: $\pm [MCd - Mce / r]^{1/2}$

EXACTITUD: es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. En el caso de ensayos microbiológicos se definirá como el porcentaje de recuperación frente al valor del inóculo. Si existen errores determinados que afectan a la exactitud, deben eliminarse a través de diseños idóneos. La obtención de resultados seguros y fiables, depende en gran medida de la correcta aplicación de las buenas prácticas de laboratorio en el ámbito microbiológico.

La puesta en marcha de un procedimiento de análisis, ya sea químico o microbiológico, consta de tres etapas sucesivas y bien definidas:

*Fase de desarrollo y prevalidación

*Fase de Validación

*Fase de aplicación de rutina.

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

*Instrumentación a utilizar.

*Microorganismos: Sensibilidad, rango de recuperación, inóculos, estabilidad.

*Tiempo (periodo de incubación, tiempo de análisis requerido).

*Costo

*Seguridad e implicaciones medioambientales.

*Robustez del método.



Una vez desarrollado el método de análisis debe prepararse el protocolo de validación. No existen demasiadas directrices oficiales que indiquen lo que hay que hacer (que parámetros hay que validar) y como debe hacerse.

CEPAS CONTROL

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

Las cepas de microorganismos deben tener un origen e identidad conocida así como una estabilidad durante la validación, debida al reactivo biológico.

En este sentido se han descrito diversas técnicas de mantenimiento de cepas encaminadas a mantener esta estabilidad.

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



Los ensayos microbiológicos no utilizan células individuales sino poblaciones de células. Los datos generados en estos ensayos son menos variables si las poblaciones celulares son homogéneas. Según la farmacopea Europea y la USP el cultivo de un microorganismo que se va a utilizar como inóculo en una validación debe proceder de una cepa que no haya sido subcultivada más de 5 veces desde la cepa de referencia original. Un subcultivo se define como la resiembra del microorganismo que se conserva a partir de un cultivo a medio fresco estéril. En el caso de microorganismos que se conservan congelados cada ciclo de congelación, descongelación y revivificación se considera un subcultivo.

CULTIVO DE TRABAJO

A partir del cultivo primario pueden realizarse 4 subcultivo de trabajo y de estos realizar 2 ó 3 siembras, según las necesidades. Aumentar el número de resiembra incrementa el riesgo de alteración fenotípica. Se considera no realizar más de 5 pases desde la cepa original.

Para obtener un subcultivo de trabajo, se siembra sobre medio inclinado o placa a partir de un cultivo primario. Se incuba en las condiciones que requiera el microorganismo hasta obtener el crecimiento adecuado, los subcultivos pueden conservarse a temperatura ambiente durante 4 semanas, si bien es preferible mantenerlos en refrigeración de 2 a 8 °C.



SUSPENSIONES ESTANDARIZADAS O NORMALIZADAS.

La estandarización de la suspensión de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados. Normalmente, la farmacopea para ensayo de recuperación microbiana en presencia de productos (Validación de la esterilidad o grado de contaminación), indican que se siembran un número determinado del microorganismo de cultivos resistentes. Es por ello que debemos de tener un sistema para asegurar el número aproximado de microorganismos que tenemos en una suspensión sin tener que esperar a los resultados de un recuento (mínimo 24 horas de esperas), ni trabajar a ciegas.

La manera más fácil de estandarizar una suspensión de microorganismo es por determinación de la turbidez en un espectrofotómetro o en escala de MacFarland. Siempre que preparamos la suspensión en un mismo medio y a la misma turbidez medida en espectrofotómetro a una longitud de onda determinada, tendremos aproximadamente el mismo número de microorganismos.

VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS.

Permite certificar que los medios de cultivos de un Laboratorio de microbiología 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 cultivos son adecuadas y garantizar su conservación.



MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

1. FÍSICOS

- a) Calor seco : 180 °C x 2 horas
- b) Calor húmedo: 15 libras. De presión x 15 minutos
- c) Tindalización
- d) Ebullición
- e) Radiaciones ionizantes
- f) Radiaciones ultravioleta

2. DESINFECTANTES QUÍMICOS

TABLA 4

Desinfección de objetos inanimados en el ambiente (Mesas, Instrumentos)	Lisol u otros compuestos fenólicos Formaldehído Glutaraldehído Compuestos cuaternarios de amonio
Excretas, vendajes, orinales	Hipoclorito de sodio Lisol u otros compuestos fenólicos
Aire	Vapor o aerosol de propilenglicol Vapor de formaldehído
Instrumentos sensibles al calor	Gas de óxido de etileno (ácidos nucleicos alquilados: el gas residual debe retirarse mediante ventilación).
Desinfección de piel o heridas	Lavados con agua y jabón Jabón o detergente que contienen hexaclorofeno o triclorocarbanilina o clorhexidina. Tintura de yodo Alcohol etílico: alcohol isopropílico Yodo povidona (hidrosoluble) Jalea o solución de Nitrofurazona.



FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE UN DESINFECTANTE QUÍMICO.

- a) Concentración del agente y tiempo de actuación: Cuando se diluye, pierde actividad y el tiempo de aplicación cambia. Cuando se mide el tiempo de muerte en función de la concentración del desinfectante da el valor (N):exponente de la concentración o coeficiente de dilución.

$$N = (\log t_2 - \log t_1) / (\log C_1 - \log C_2)$$

$$C_n \times \Delta t = K \quad \text{ó} \quad K = (C_n)(\Delta t)$$

Donde: C: es la concentración del agente

T: es el tiempo de actuación

N y K: coeficiente de dilución.

- b) Número y localización de los microorganismos.
- c) Materia orgánica es lo que más influye porque con ella reacciona.
- d) pH: provoca cambios en la molécula del desinfectante o cambios en la superficie. Si el pH aumenta normalmente los desinfectantes pasan a la forma iónica. Cuando se alcaliniza el pH, la bacteria pasa a tener muchas cargas negativas en la superficie y tendrá atracción con los desinfectantes con carga positiva. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos y los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos.
- e) Temperatura: La mayoría son más eficaces al aumentar la temperatura. Para el fenol, la subida de 10 grados representa multiplicar por 5 o por 8 la eficacia.
- f) Dureza del agua: Algunos desinfectantes son afectados por iones Ca^{+2} o iones Mg^{+2} .



g) Naturaleza del microorganismos: Las esporas son las más resistentes seguida de las **Micobacterias**, las gram (-) y por último las más sensibles a la desinfección son gram (+).

TRICLOSAN

5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy) fenol 2,4,4-tricloro-2- hydroxydifetil eter.

Jabón para mano Triclosan al 0.3 % (Germicida y bactericida).

PROPIEDADES

*Amplio espectro de acción antimicrobiano.

*Acción contra bacterias gram positivas y gram negativas especialmente frente a gérmenes que descomponen el sudor y la orina.

*El pH no influye en la eficacia del ingrediente activo buena tolerancia cutánea y fisiológica, Disuelto en efluentes se descompone rápidamente por la luz.

MECANISMO DE ACCIÓN

*Potente inhibidor de ciclooxigenasa y lipoxigenasa, llaves enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico resultando una formación reducida de metabolitos proinflamatorios, tales como prostaglandina E₂ y leucotrienos B₄.

*Reduce efectos citotóxico del Laurilsulfato de sodio sobre fibroblastos gingivales de humanos.

*Actividad antiinflamatoria y antibacteriana.

Triclosan es un jabón líquido concentrado y formulado específicamente, para brindar una acción germicida y bactericida en el área donde es aplicada. Puede utilizarse con la frecuencia requerida sin experimentar resequedad de la piel. Es efectivo para el uso del personal médico, de la industria de alimentos, cajeros y en todo lugar donde es necesario el control de crecimiento, transmisión y contaminación de microorganismos.



HIPÓTESIS

PRECISIÓN: (Repetibilidad)

Ho: No existe correlación entre X y Y.

Hi: Existe correlación entre X y Y.

EXACTITUD:

Ho: El porcentaje recuperado no esta incluido en el intervalo.

Hi: El porcentaje recuperado esta incluido en el intervalo.



MATERIAL Y MÉTODO



TIPO DE ESTUDIO: Experimental

UNIVERSO: Desinfectantes de acción bactericida utilizados en asépsia y desinfección.

MUESTRA: Triclosan al 0.3%.

De un galón con 3.78 litros se tomaron 3.6 ml por cada ensayo de desinfectante y 2 ml para el ensayo del neutralizante. Dicha muestra fue proporcionada por el Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos.

CRITERIOS: Los criterios utilizados en la selección de la muestra fueron:

- 1-Productos etiquetados bajo el concepto de efecto bactericida.
- 2-Productos más utilizados en áreas clínicas por el Ministerio de Salud.

ÁREA DE ESTUDIO: El presente estudio fue realizado en el departamento de control microbiológico del Laboratorio Nacional de Control de Calidad de Medicamentos.



VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. 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 estaba especificada se realizó a 25-26⁰C.

2. ESTERILIDAD

El número total de placas petri, tubos, y frascos de los medios de cultivo preparados se incubaron a 35-37⁰C durante 24-48h.

3. ESTABILIDAD

Cada 8 días se verificó la esterilidad y pH de los medios de cultivo para verificar su buen estado. El procedimiento se realizó por un periodo de un mes.

4. PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

Se determinó por diferentes métodos:

4.1 Para medios selectivos y diferenciales: **Sólidos**

*Se dividió el plato en tres secciones se inocularon tres diferentes microorganismos en cada sección, seleccionando un microorganismo que su crecimiento fuese inhibido por el medio, otro microorganismo que presentara crecimiento con sus características y un microorganismo que creciera, pero no con las características esperadas. Luego se incubaron por 24h a 35-37⁰C y se verificó el crecimiento.



4.2 MEDIOS LÍQUIDOS

Se prepararon suspensiones bacterianas con $1-3 \times 10^2$ bacterias/ml y se inoculó 1ml de suspensión, se incubaron por 24h a $35-37^{\circ}\text{C}$ y se verificó el crecimiento por la presencia de turbidez.

4.3 MEDIOS GENERALES

Se tomó 1ml de la suspensión $1-3 \times 10^2$ bacterias/ml y se sembró en placa adicionando 15 –18 ml del medio de cultivo, se agitó con movimientos circulares, se dejó solidificar y se incubó por 24h a $35-37^{\circ}\text{C}$. Se procedió al recuento en placa. (Ver anexo 1y 11)



CARACTERIZACION DE CEPAS DE TRABAJO

Las bacterias utilizadas en el ensayo fueron obtenidas de muestras aisladas en pacientes hospitalarios, las que posteriormente se caracterizaron con el objetivo de seleccionar la que cumpliera con los rasgos característicos de su fenotipo.

Una vez obtenida la cepa se procede a la realización de la marcha analítica.

CARACTERIZACION DE *Escherichia coli*.

La bacteria se encontraba en agar nutritivo de donde se tomó una asada y se inoculó en caldo BHI, se incubó por 24h a 37⁰C, de este se tomó una asada y se transfirió a C. Verde Brillante y a C. Mac Conkey, se dejó incubando por 24h a 37⁰C. Transcurrido este tiempo se verifica producción de gas, de este tubo se tomó una asada se inoculó en Caldo E. Coli a 45⁰C por 24h, transcurrido el tiempo se verifica producción de gas y por último se tomó una asada, se sembró en agar Mac Conkey se incubaron por 24h a 37⁰C se verificó crecimiento con la aparición de colonias grandes y rojas, y en agar EMB obteniendo colonias verdosas con brillo metálico y se procedió a realizar tinción de gram.

La aparición de colonias rojas, generalmente no mucosas, de bacterias gram (-) con morfología cocobacilar, rodeadas a veces de precipitación rojiza, indica la presencia de *Escherichia coli*. (Ver tabla 5 y anexo 2, 12)



CARACTERIZACION de *Staphylococcus aureus*.

La bacteria se encontraba en Agar nutritivo, de donde se tomó 1 asada y se inoculó en caldo BHI, se incubó por 24h a 37° C. Transcurrido el tiempo de incubación se verificó la turbidez, de este se tomó 1 asada respectivamente y se inoculó a Agar sangre de carnero y otra a Agar chapman se incubaron por 24h a 36-37° C.

El crecimiento de colonias amarillo-dorado en el Agar Chapman y la hemólisis positiva en Agar sangre de carnero confirmaron la presencia de ***Staphylococcus aureus***. (Ver tabla 7 y anexo 3, 13)

CARACTERIZACION de *Pseudomona aeruginosa*.

La bacteria se encontraba en Agar nutritivo, se tomó 1 asada y se inoculó en caldo BHI, se incubó por 24h a 37° C. Transcurrido este tiempo de incubación se verificó la turbidez y se tomó 1 asada para inocular en Agar cetrimide el que se incubó por 24h a 37° C, de este se obtuvieron colonias verdes fluorescentes por lo que se procedió a tomar 1 asada respectivamente e inocular a Agar S.S, Agar F, Agar P, Agar Sangre de carnero y Agar Cetrimide los que se incubaron por 24h a 37° C excepto el Agar cetrimide que se incubó a 42° C.

El crecimiento de colonias verdes fluorescentes a la luz UV en los agares F, P y cetrimide; así como la hemólisis positiva en agar Sangre de carnero y el viraje del agar S.S de rosado a amarillo confirmaron la presencia de ***Ps. aeruginosa***. (Ver tabla 6 y anexo 4, 14)



SUSPENSIÓN BACTERIANA

- 1- Se sembró en la superficie de botellas de dilución de agar antibiótico #1 y se incubó a 37°C, respectivamente. A las cepas se les dieron tres pases de cultivo en agar antibiótico #1, es decir, la operación descrita se realiza 2 veces más con intervalos de 18-24 horas. (Ver anexo 5).
- 2- Se colocó en un erlenmeyer estéril 20ml de diluyente. Se arrastró con el asa el cultivo anteriormente obtenido y se colocó en el diluyente, agitando hasta obtener suspensiones homogéneas.
- 3- Se ajustaron las suspensiones bacterianas midiendo en el espectrofotómetro a 620 nm hasta obtener las siguientes valores de absorvancia:
0.2-0.3 bacilos gram negativos (***E. coli*** y ***Ps. aeruginosa***)
0.3-0.4 cocos gram positivos (***St. Aureus***)
Esta suspensiones de ensayo así ajustadas contienen entre $1-3 \times 10^8$ bacterias/ml.
- 4- A partir de estas suspensiones bacterianas, se utilizó diluyente (peptona) y tubos estériles, se prepararon las siguientes diluciones.

No tubos	1	2	3	4	5	6
Susp. bact. (ml)	0.4en3.6	0.4en3.6	0.4en3.6	0.4en3.6	0.8en3.2	0.2en3.8
Conc. bact. (ufc/ml)	-	-	-	$1-3 \times 10^4$	$2-6 \times 10^3$	$1-3 \times 10^2$



- 5- Las suspensiones de ensayo para el neutralizante contienen $2-6 \times 10^3$ bacterias/ml correspondiendo a la quinta dilución. Y la suspensión utilizada en el ensayo del desinfectante contiene $1-3 \times 10^2$ bacteria/ml, correspondiendo a la sexta dilución.

Se obtuvo el recuento bacteriano tomando 3 alícuotas de 1ml de la sexta dilución, se sembró en placas petri, adicionando de 15-20ml de agar recuento en placa previamente esterilizado y mantenido en baño María. Se mezcló antes de la solidificación con movimientos circulares sin que el agar alcanzara la tapa de la placa petri. Repetir operación para obtener 3 placas de recuento. Se dejó solidificar, y se invirtieron las placa se incubó por 48 horas a 37^0 C.

- 6- Transcurrido el tiempo se realizó el recuento de colonias de las placas obteniendo el valor medio de las 3 placas. (Ver anexo 6).



PREPARACIÓN DE NEUTRALIZANTES

NEUTRALIZANTE “A”

Tween 80 30ml (32.25g)

Bisulfito sódico al 40%, 6.25 ml.

Tiosulfato sódico. $5H_2O$, 3.922g

Se colocó un beaker de 50ml en la balanza y se añadió con una pipeta Tween 80 hasta 32.25g. Se disolvió en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del beaker), que se traspasaron a un matraz aforado de 250ml. Se añadió en el matraz color ámbar, diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Se pesó y se añadieron el resto de los componentes hasta su dilución, luego se aforó con diluyente hasta 250ml.

Se ajustó a pH 7 con una solución de NaOH 0.1N y se esterilizó por filtración (Millipore, $0.45\mu m$). Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añade igual volumen de diluyente (no agua destilada).



NEUTRALIZANTE “B”

Tween 80, 30ml (32.25g)

Bisulfito sódico al 40%, 6.25ml.

Tiosulfato sódico. $5H_2O$, 3.922g

Tioglicolato sódico, 2.5g

L-cisteína 0.75g.

Se colocó un beaker de 50ml en la balanza y se añadió con una pipeta Tween 80 hasta 32.25g. Se disolvió en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del beaker), que se traspasaron a un matraz aforado color ámbar de 250ml. Se añadió en un matraz diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Se pesó y se añadió el resto de los componentes hasta su dilución, y a continuación, se aforó con diluyente hasta 250ml.

Se ajustó a pH 7 con una solución de NaOH 0.1N y se esterilizó por filtración (Millipore, $0.45\mu m$). Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se añadió igual volumen de diluyente (no agua destilada).

NEUTRALIZANTE “C”

Tween 80, 30ml (32.25g)

Bisulfito sódico al 40%, 6.25ml.

Tiosulfato sódico. $5H_2O$, 3.922g

Lecitina 1g.

Diluyente (triptona sal) csp 250ml.

Se colocó un beaker de 50ml en la balanza y se añadió con una pipeta Tween 80, hasta 32.25g. Se disolvió en varias alícuotas de diluyente (hasta arrastrar todo el contenido del vaso) que se traspasaron a un matraz aforado color ámbar



de 250ml. Se añadió en el matraz diluyente hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente. Se pesó y se añadió el resto de los componentes, excepto lecitina, hasta su dilución, y a continuación, se aforó con diluyente hasta 250ml.

Se ajustó a pH 7 con una solución de NaOH 0.1N y se esterilizó por filtración (Millipore, 0.45 μ m). Las cantidades descritas corresponden al neutralizante a doble concentración. Para prepararlo a concentración simple se le añade igual volumen de diluyente (no agua destilada).

Diluyente (Tryptona sal)

Peptona de caseína 1g.

NaCl 8.5g

Agua destilada 100ml

Se disolvió a ebullición, ajustar pH a 7.2 y esterilizar en autoclave 20 minutos a 121 °C.

NEUTRALIZANTE “D”

Tween 80, 3ml

L-Histidina, 0.1g

Tiosulfato sódico, 0.5g

Lecitina, 0.3g

Tampón Fosfato pH 7 (KH_2PO_4 , 140.5 mg/L., Na_2HPO_4 , 219.7mg/L

Csp 100ml

Se preparó con todos los componentes, excepto la lecitina, que se añadió tras la esterilización del resto de los componentes en el autoclave a 120°C, durante 15 minutos.



ENSAYO DEL NEUTRALIZANTE

1. Para cada neutralizante y/o cepa bacteriana se prepararon 2 tubos que contenían cada uno:

A: 2ml de agua destilada estéril.

B: 2ml de desinfectante a concentración 1/5 de la máxima de uso.

2. Se añadió a cada uno de los tubos anteriores 2ml de neutralizante. Se agitó y se mantuvo durante 10 minutos a 20°C.

3. Transcurrido el tiempo, se añadió a cada tubo 0.2ml de solución bacteriana que contenía $2-6 \times 10^3$ bacterias/ml. Se agitó y se mantuvo durante 5 minutos a 20°C.

4. Se tomó de cada tubo 3 alícuotas de 1ml y se inoculó en platos petri, se añadió a cada placa 15-20ml de medio de recuento en placa previamente esterilizado y mantenido en baño María a temperatura entre 45-48°C. Se mezcló bien antes de la solidificación con movimientos circulares, sin que el agar alcanzará la tapa de la placa petry. Se dejó solidificar, y luego se invirtieron las placas y se incubaron por 48h a 37°C.

Se procedió al recuento en placa. Se obtuvo el valor medio de tres placas controles en las que se adicionó agua destilada (C), y el valor medio de tres placas con desinfectante y neutralizante (n). (Ver tabla 14,15,16 y anexo 7 ,15,16, 17)



ENSAYO DEL DESINFECTANTE

- 1- Se preparó tubos con 4.5ml de neutralizante a simple concentración.
- 2- Se prepararon tubos con 3.6ml del desinfectante.
- 3- Se añadió 0.4ml de suspensión ensayo ($1-3 \times 10^2$ bact./ml), a cada tubo de desinfectante. Se agitó y se mantuvo durante 5 minutos a 20°C .
- 4- Transcurrido el tiempo, se tomó 1ml de cada tubo y se añadió a un tubo con neutralizante. Se agitó y se mantuvo durante 10 minutos a 20°C .
- 5- A continuación, se tomó de cada uno de los tubos tres alícuotas de 1ml y se procedió al recuento en placa, como se ha descrito anteriormente (se obtienen tres placas de desinfectante utilizado), incubar al menos por 48 horas a 37°C , (según la cepa).
5. Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento de colonias en placa. Se obtuvo el valor medio de las tres placas del desinfectante (d). (Ver tabla 20,21, 22 y anexo 8,15,16,17)



CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

CALIBRACIÓN SPECTRONIC-20

PROCEDIMIENTO

1. Se pesó 2.8 g KOH y disolvió en agua destilada 1000 ml.
2. Se pesó 0.3029g de dicromato de potasio y disolvió en KOH 0.05N (100 ml).
Se determinó la longitud de onda analítica del cromato de potasio (40mg/L)

Nota: Se deberá de llenar entre cada uno de las lecturas: Cromato y blanco.

CALIBRACIÓN DEL pH-METRO

- a) Calibración con 4 bufferes a pH diferentes.

REACTIVOS

Buffer 3

Buffer 4

Buffer 7

Buffer 10

Nota: Solamente con pH 3 se procede a calibrar.

PROCEDIMIENTO

- a) Se encendió el equipo aproximadamente 10 minutos antes de iniciar.
- b) Se transfirió a un beaker de 100ml aproximadamente de agua, 20ml de solución de control en función del pH, se ajusta (con botón estandarización).
- c) Se transfirió a un beaker de 100ml aproximadamente 20ml de buffer pH 3, se sumergió el electrodo y con el botón control en pH, se ajustó el pH 3 con botón estandarización).



d) Se leyó los valores de pH y milivoltios (posición Mv) para cuatro soluciones buffer seleccionadas (pH 3, pH 4, pH 7, pH 10). Iniciando del pH más bajo al más alto. Se repitió el proceso hasta obtener 5 lecturas para cada buffer, teniendo cuidado al lavar el electrodo y secarlo en cada proceso.

Nota: Es importante tener en cuenta la temperatura de lecturas de búfferes (ajustar con botón temperatura).

e) Se graficó los valores de pH los búfferes con valores de milivoltios para modelo de regresión.

f) Se graficó las lecturas de pH-metro con el pH de las soluciones búferes para encontrar el modelo de calibración.

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE GRAM

- 1- Se fijó el frotis con calor.
- 2- Se cubrió con cristal violeta (Colorante básico).
- 3- Se lava con agua. No se seca.
- 4- Se cubrió con yodo de gram (todas se tiñen de azul).
- 5- Se lavó con agua, no se seco.
- 6- Se decoloró durante 10 a 30 segundos con agitación suave en acetona (30 ml) y alcohol (70ml).
- 7-se lavó con agua. No se seco.
- 8- Luego se cubrió durante 10 a 30 segundos con safranina (solución a 2.5% o en alcohol a 95%).
- 9- Se lavó con agua y se dejó secar.



Las células gram (+) retienen el complejo cristal-yodo y permanece de color azul, las gram (-) se decoloran completamente con alcohol y al aplicarse un colorante de contraste (safranina es rojo). Toman el color rojo las gram (-)

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AGAR SANGRE DE CARNERO

Se preparó con agar casoy y sangre de humano o sangre de carnero. Todo el material utilizado tiene que estar estéril, se trabajó en la campana con todas las condiciones de asépsia.

PREPARACIÓN

Se disuvió el agar casoy 40g/litro y se disolvió 7.5g/litro. Se esterilizó el agar casoy se dejó enfriar y mezcló con la sangre agitando moderadamente hasta que se disolviera en todo el medio. Por último se vertió en placas y realizó pruebas de esterilidad en incubadora por 48 horas.

PROCEDIMIENTO PARA LAVADO DE CRISTALERÍA NUEVA

- a) Se depositó la cristalería nueva en agua caliente por una hora.
- b) Luego se sumergió en una solución al 2% HCL, con una relación al 2% por cada tres litros de agua destilada (24 horas).
- c) Se lavó con detergente y enjuagó con agua de grifo (3 veces).
- d) Se sumergió y se enjuagó con agua destilada (3 veces).
- e) Se realizó prueba de lavado con azul de bromotimol (10 ml de muestra de agua más 2 a 3 gotas de azul de bromotimol, coloración azul o verdosa se continua enjuagando, si es coloración amarilla realizar secado).



- f) Se escurrió y secó cristalería en un horno a 100°C por una hora.
- g) Por último se empacó la cristalería y se esterilizó en horno a 121°C durante dos horas.

PROCEDIMIENTO PARA LAVADO DE CRISTALERIA SUCIA

- a) Se descontaminó en autoclave a 12°C .
- b) Se descartaron los desechos en bolsa plástica.
- c) Se lavó cristalería con la ayuda de hisopos, paste y detergente.
- d) Se enjuagó y sumergió en pana plástica conteniendo una solución de cloro y detergente, por 24 horas.
- e) Se procedió a lavar y enjuagar nuevamente con agua de grifo 3 veces.
- f) Se sumergió en agua destilada 3 veces.
- h) g) Se le realizó prueba con azul bromotimol (10 ml de muestra de agua más 2 a 3 gotas de azul de bromotimol, coloración azul o verdosa se continua enjuagando, si es coloración amarilla realizar secado).
- i) Se escurrió y secó cristalería en un horno a 100°C por una hora.
- j) Por último se empacó la cristalería y se esterilizó en horno a 121°C durante dos horas.



MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPOS

- Esteroscopio (Reichert).
- Microscopio (SWIFT instruments).
- Contador de colonias (FISHER Scientific).
- Vortex-Genie (Scientific Industries).
- Incubadora (Precision).
- pH-metro (FISHER Scientific).
- Bomba de filtración (Emerson).
- Spectrofotometro-20 (FISHER Scientific).
- Campana de flujo laminar (LABCONCO).
- Ultrasonido (Aquasonic).
- Refrigerador (FOGEL).
- Balanza de brazo (FISHER Scientific).
- Baño María (FISHER SCIENTIFIC).
- Horno Automático (HALLO).
- Autoclave (LLAMATO).
- Hotplate (CORNING).
- Horno (Imperial).
- Balanza analítica (LLAMATO).

CRISTALERIA

Balones 100 ml Fortune DINA (8)

Balones 1000 ml Kimax (1)

Balones 50 ml, Assitent (4)

Balones 25ml, Kimax (3)



Balones ámbar 100ml Assitent (2)
Pipetas volumétricas CORNING 1ml (33)
Pipetas volumétricos 2ml Fortune (10)
Pipetas volumétricas 5ml Qualicolor (16)
Pipetas volumétricas 10ml Witeg (3)
Celdas 10x75mm Pyrex 8 unidades
Beaker 50ml Pirex (4)
Beaker 100ml Pirex (7)
Erlenmeyer 50ml Pirex (6)
Probeta 50ml Pirex (1)
Platos petry 100X15mm Pirex (57)
Tubo de ensayo
Botellas de Dilución 160ml Kimax (3)
Porta objeto 75x25mm SPECIMEN (3)

REACTIVOS

Agua destilada estéril
Azul bromotimol
Acido clorhidrico
Bisulfito sódico
Buffer 3
Buffer 4
Buffer 7
Buffer 10
Cloruro de sodio
Cristal violeta
Dicromato de potasio
Etanol



Hidróxido de potasio 0.05N

Hidróxido de sodio 0.1N

L-cisteína

L-histidina

Lecitina

Safranina

Tampón fosfato pH 7

Tiosulfato sódico

Tioglicolato sódico

Tween 80

Yodo

MEDIOS DE CULTIVOS:

- Agar antibiótico No.1
- Agar cetrimide
- Agar chappman (A.110)
- Agar conteo en placa (PCA)
- Agar F
- Agar levine (A. EMB)
- Agar mac conkey
- Agar ***Salmonella shiguela*** (A. S.S)
- Agar P
- Caldo brila bovillon (C. verde brillante)
- Caldo ***E. coli***
- Caldo him herz bovillon (C.BHI)
- Caldo Mac conkey



ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Cetrimide Agar
Casa Comercial: Merck
Número de lote: 0500VK637684104

*Datos de preparación del medio de cultivo.

Fecha de preparación :11 de julio

Cantidad pesada: 6.67 g

Volumen de agua: 150ml

*Datos de la esterilización de medios de cultivo.

Tiempo de esterilización: 15 minutos

Temperatura de esterilización: 121⁰C

Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH

Temperatura: 25⁰C

Temperatura: 26⁰

pH de la etiqueta: 7.2±0.2

Lectura pH: 7.1

*Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 10 platos

Fecha de inicio de incubación: 11 de julio

¿Cumple esterilidad?: Sí

*Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Inhibición	Reacción positiva	Reacción negativa
<i>Ps. aeruginosa</i>		X	
<i>Escherichia.coli</i>			X
<i>St. aureus</i>	X		

*Estabilidad.

Efectuado por un periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Agar Levine EMB
Casa Comercial: Merck
Número de Lote: 53063277

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 4g
Volumen de agua: 100ml

*Datos de la esterilización de medios de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰C
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH
Temperatura: 37⁰C
Temperatura: 35⁰ C

pH de la etiqueta: 7± 0.2
Lectura pH: 6.9

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 5 platos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí

*Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Inhibición	Reacción positiva	Reacción negativa
<i>Pseudomona aeruginosa</i>			X
<i>Escherichia coli</i>		X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X		

*Estabilidad.
Efectuado por un periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Agar Mac Conkey
Casa Comercial: Merck
Número de lote: 230-V22965

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 5 g
Volumen de agua: 100ml

*Datos de la esterilización de medios de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰C
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH
Temperatura: 25⁰C
Temperatura: 26⁰

pH de la etiqueta: 7.1±0.1
Lectura pH: 7.1

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 5 platos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí

*Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Inhibición	Reacción positiva	Reacción negativa
<i>Ps. aeruginosa</i>			X
<i>Escherichia coli</i>		X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X		

*Estabilidad.
Efectuado por un periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Agar Chapman
Casa Comercial: Merck
Numero de lote: 0500V972869738

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 14.65 g
Volumen de agua: 100ml

*Datos de la esterilización de medios de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰C
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH
Temperatura: 25⁰C
Temperatura: 26⁰
pH de la etiqueta: 7± 0.2
Lectura pH: 6.8

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 5 platos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí

*Promoción de crecimiento.

Microorganismo	Inhibición	Reacción positiva	Reacción negativa
<i>St. epidermides</i>			X
<i>Escherichia coli</i>	X		
<i>Staphylococcus aureus</i>		X	

*Estabilidad.
Efectuado por un periodo de: 1 mes. (ver anexo 11)



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Caldo *E. coli*
Casa Comercial: Becton Dickinson
Numero de lote: 0032004

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 4 g
Volumen de agua: 100 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.
Temperatura: 25⁰C
Temperatura: 26⁰C

pH de la etiqueta: 6.9± 0.2
pH de la lectura: 7

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 10 tubos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí
Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.
Recuperación: Sí

*Estabilidad.
Efectuado por periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Plate count Agar
Casa Comercial: Biocen
Número de lote: 0500002

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 10 de enero
Cantidad pesada: 31.5g
Volumen de agua: 1800 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.
Temperatura: 37°C
Temperatura: 39°C
pH de la etiqueta: 7±0.2
pH de la lectura: 7.1

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 3 frascos de 600 ml
Fecha de inicio de incubación: 10 de enero
¿Cumple esterilidad?: Sí
Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.
Recuperación: Sí
% Recuperación: 98.6%

*Estabilidad.
Efectuado por periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Caldo Mac Conkey
Casa Comercial: Becton Dickinson
Número de lote: D8DEZT

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 2 g
Volumen de agua: 50 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.

Temperatura: 25⁰C

Temperatura: 26⁰C

pH de la etiqueta: 7.3±0.2

pH de la lectura: 7.2

*Datos de la prueba de esterilidad.

Número de unidades preparadas: 5 tubos

Fecha de inicio de incubación: 11 de julio

¿Cumple esterilidad?: Sí

Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.

Recuperación: Sí

*Estabilidad.

Efectuado por periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Him Herz Bovillon
Casa Comercial: Merck
Número de lote: 925V727993

Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 4 g
Volumen de agua: 100 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.
Temperatura: 25⁰C
Temperatura: 26⁰C

pH de la etiqueta: 7.4±0.2
pH de la lectura: 7.4

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 10 tubos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí
Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.
Recuperación: Sí

*Estabilidad.
Efectuado por periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Brila Bovillon
Casa Comercial: Merck
Número de lote: 0500V682054537

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de julio
Cantidad pesada: 2 g
Volumen de agua: 50 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.
Temperatura: 25°C
Temperatura: 26°C

pH de la etiqueta: 7.2±0.2
pH de la lectura: 7.2

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 5 tubos
Fecha de inicio de incubación: 11 de julio
¿Cumple esterilidad?: Sí
Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.
Recuperación: Sí

*Estabilidad.
Efectuado por periodo de: 1 mes



PLANILLA DE RESULTADOS EN LA VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Nombre del medio de cultivo: Antibiótico # 1
Casa Comercial: Becton Dickinson
Número de lote: D7DDLH

*Datos de preparación del medio de cultivo.
Fecha de preparación: 11 de diciembre
Cantidad pesada: 8 g
Volumen de agua: 250 ml

*Datos de la esterilización del medio de cultivo.
Tiempo de esterilización: 15 minutos
Temperatura de esterilización: 121⁰
Presión de esterilización: 18 libras de presión

*Determinación del pH.
Temperatura: 25⁰C
Temperatura: 26⁰C
pH de la etiqueta: 6.6±0.2
pH de la lectura: 6.5

*Datos de la prueba de esterilidad.
Número de unidades preparadas: 25 tubos
Fecha de inicio de incubación: 11 de diciembre
¿Cumple esterilidad?: Sí
Temperatura de incubación: 36-37⁰C

*Promoción de crecimiento.
Recuperación: Sí

*Estabilidad.
Efectuado por periodo de: 1 mes



RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

TABLA 5

Escherichia coli

<i>Escherichia coli</i>	C. Mac Conkey	C. verde-brillante	C. <i>E. coli</i>	A.Sangre. Carnero	A. Mac Conkey	A. EMB	Tinción gram	Resultado
1A	Crecimiento característico, turbidez, gas.	Viraje, producción de gas abundante.	Producción de gas	Hemólisis (-)	Crecimiento característico, color rosado	Crecimiento característico verde brillante metálico	Bacilos cortos gram (-) rojas	Se seleccionó 1A
1B	No crecimiento, no gas	No gas, no viraje	No gas	Hemólisis (-)				

Interpretación: La cepa 1 A cumple con las especificaciones. (ver anexo 20)

TABLA 6

Pseudomona aeruginosa

<i>Ps. aeruginosa</i>	Cetrimide 37° C	Cetrimide 42° C	A.S.C	A. P y F	Tinción de gram	Resultados
2A	Colonias verde-Fluorescente	Verde fluorescente U.V.	Hemólisis (+)	Crecimiento Característico	Bacilos cortos gram (-)	Se seleccionó la 2 A
2B	Colonias cremosas					
2C	Colonias cremosas					

Interpretación: La cepa 2 A cumple con las especificaciones. (ver anexo 21)



TABLA 7

Staphylococcus aureus

<i>Staphylococcus aureus</i>	A. chapman	A.S.C	Tinción de gram	Resultados
3 A	Crecimiento característico Pigmentos amarillo-oro	Hemólisis (+)	Cocos en racimos gram (+)	Se seleccionó la 3 B por ser la más resistente
3 B	Crecimiento característico Pigmentos amarillo-oro.	Hemólisis (+)		

Interpretación: La cepa 3 B cumple con las especificaciones.



RESULTADOS DEL ENSAO DEL NEUTRALIZANTE

El neutralizante es efectivo para determinado desinfectante, si al menos el 50% de bacterias son protegidas, es decir:

$$n \geq 0.5 C$$

Se realizó el recuento en placa y se calculó el porcentaje de células protegidas por el neutralizante con la siguiente ecuación:

NEUTRALIZANTE "A"

TABLA 8

Escherichia coli

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	288	300	300	296
C (ufc/ml)	300	265	260	275
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.

TABLA 9

Staphylococcus aureus

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	396	380	392	389.3
C (ufc/ml)	315	305	310	310
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.



TABLA 10

Pseudomona aeruginosa

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	120	148	148	138.6
C (ufc/ml)	276	258	249	261
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.

NEUTRALIZANTE “B”

TABLA 11

Escherichia coli

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	288	300	300	296
C (ufc/ml)	284	252	268	268
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.

TABLA 12

Staphylococcus aureus

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	396	380	392	389.3
C (ufc/ml)	308	354	325	329
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.



TABLA 13

Pseudomona aeruginosa

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	120	148	148	138.6
C (ufc/ml)	246	258	269	257.6
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.

NEUTRALIZANTE "C"

TABLA 14

Escherichia coli

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	288	300	300	296
C (ufc/ml)	284	252	268	268
n (ufc/ml)	146	160	146	150

Interpretación: Como $n > 0.5 C$, cumple con el criterio.

TABLA 15

Staphylococcus aureus

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	396	380	392	389.3
C (ufc/ml)	304	356	316	325.3
n (ufc/ml)	200	208	200	202.6

Interpretación: Como $n > 0.5 C$, cumple con el criterio.



TABLA 16

Pseudomona aeruginosa

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	120	148	148	138.6
C (ufc/ml)	276	240	268	261.3
n (ufc/ml)	240	200	224	221.3

Interpretación: Como $n > 0.5 C$, cumple con el criterio.

NEUTRALIZANTE "D"

TABLA 17

Escherichia coli

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	288	300	300	296
C (ufc/ml)	251	268	252	257
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.

TABLA 18

Staphylococcus aureus

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	396	380	392	389.3
C (ufc/ml)	365	385	349	366.3
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.



TABLA 19

Pseudomona aeruginosa

Placa	1	2	3	Promedio
R (ufc/ml)	120	148	148	138.6
C (ufc/ml)	210	258	215	227.6
n (ufc/ml)	0	0	0	0

Interpretación: Como $n < 0.5 C$, no cumple con el criterio.



RESULTADO DEL ENSAYO DEL DESINFECTANTE

Para que una concentración de desinfectante sea bactericida tiene que producir una reducción de 10^5 en el número de células bacterianas, es decir:

$$d \leq c/10$$

Se calculó la reducción logarítmica partiendo de los datos obtenidos en el recuento de la suspensión bacteriana (que hacemos mediante diluciones sucesivas hasta un total de 10^{-6}). Por tanto, el valor inicial de la suspensión es $c \times 10^{-6}$, que sufre una dilución 1/10 en el desinfectante y otra dilución 1/10 en el neutralizante, con lo que quedó $c \times 10^{-4}$. La reducción logarítmica se calculó de la siguiente manera:

$$\log(C \times 10^4) - \log d$$

Reducción logarítmica: $\log(C \times 10^4)$ cuando $d=0$

$\log(C \times 10^4) - \log d$ cuando $d>0$



TABLA 20

Escherichia coli.

	Recuento Inicial		Recuento de sobrevivientes		Reducción Logarítmica	
	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
Analista 1	296.6	297.3	205.3	206.6	4.15	4.15
			201.3	204.3	4.16	4.16
			202.6	206.6	4.16	4.15
Analista 2	278.6	267.3	157.3	157.3	4.24	4.23
			158.6	153.3	4.24	4.24
			157.3	160.6	4.24	4.22

Interpretación del ensayo: El desinfectante no cumple, por no producir una reducción de 5 unidades logarítmicas.

TABLA 21

Staphylococcus aureus.

	Recuento inicial		Recuento de sobrevivientes		Reducción Logarítmica	
	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
Analista 1	389.3	393.3	89.3	88.3	4.63	4.64
			90	89.6	4.63	4.64
			94	94.6	4.61	4.61
Analista 2	308	298.6	83	84.6	4.56	4.54
			82.6	89	4.57	4.52
			83.3	90.3	4.56	4.51

Interpretación del ensayo: El desinfectante no cumple, por no producir una reducción de 5 unidades logarítmicas.



TABLA 22

Pseudomona aeruginosa.

	Recuento inicial		Recuento de sobrevivientes		Reducción Logarítmica	
	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2
Analista 1	185.3	185	138.6	135.6	4.12	4.13
			140.6	130.3	4.11	4.15
			140.1	127.3	4.12	4.16
Analista 2	162.6	169	134.6	126	4.08	4.12
			135.3	123.6	4.07	4.13
			132	129.6	4.07	4.11

Interpretación del ensayo: El desinfectante no cumple, por no producir una reducción de 5 unidades logarítmicas.



VALIDACIÓN DEL MÉTODO DILUCIÓN-NEUTRALIZACIÓN (Ensayo del Desinfectante)

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Escherichia coli

$$\bar{Y} = 4.19$$

$$\sum Y = 50.34$$

$$\sum Y^2 = 211.19$$

$$S = 0.00017$$

$$CV = 0.04\%$$

Interpretación: Como CV es $\lt 5\%$, cumple con el criterio.

Staphylococcus aureus

$$\bar{Y} = 4.58$$

$$\sum Y = 55.02$$

$$\sum Y^2 = 252.29$$

$$S = 0.04$$

$$CV = 1.03\%$$

Interpretación: Como CV es $\lt 5\%$, cumple con el criterio.

Pseudomona aeruginosa

$$\bar{Y} = 4.11$$

$$\sum Y = 49.38$$

$$\sum Y^2 = 203.20$$

$$S = 0.02$$

$$CV = 0.6\%$$

Interpretación: Como CV es $\lt 5\%$, cumple con el criterio.



REPRODUCIBILIDAD ANALISIS DE VARIANZA ANALISTAS –DIAS

TABLA 23

Escherichia coli

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrado	Fcal	F0.05
Analista (α)	1	0.0192	0.0192	384	38.51
Día (δ)	2	0.0001	5×10^{-5}	1.33	6.06
Error (ϵ)	8	3×10^{-4}	3.75×10^{-5}	-----	-----

V interanalista: ± 0.0564 .

Interpretación:

Fa > Fgla, el método no es reproducible por los analistas.

Fd < Fgld, el método es reproducible en distintos días por un mismo analista

TABLA 24

Staphylococcus aureus

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrado	Fcal	F0.05
Analista (α)	1	0.0208	0.0208	16.64	38.51
Día (δ)	2	2.5×10^{-3}	1.25×10^{-3}	7.14	6.06
Error (ϵ)	8	1.4×10^{-3}	1.75×10^{-4}	-----	-----

V interdía: ± 0.0181

Interpretación:

Fa < Fgla, el método es reproducible por los analistas.

Fd > Fgld, el método no es reproducible en distintos días por un mismo analista.



TABLA 25

Pseudomona aeruginosa

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrado	Fcal	F0.05
Analista (α)	1	3.3×10^{-03}	3×10^{-03}	1.42	38.51
Día (δ)	2	4.2×10^{-03}	2.1×10^{-03}	21	6.06
Error (ϵ)	8	8×10^{-04}	1×10^{-04}	-----	-----

V inter día: ± 0.0239

Interpretación:

Fa < Fgl_a, el método es reproducible por los analistas.

Fd > Fgl_d, el método no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

EXACTITUD (PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS RECUPERADOS).

TABLA 26

Escherichia coli

	Día 1	Día 2	Promedio	S	CV
Analista 1	69.21	69.49	63.26	2.5.92	9.3
	67.86	68.71			
	68.30	69.49			
	56.46	58.84			
Analista 2	56.92	57.35			
	56.46	60.08			

TABLA 27

Staphylococcus aureus

	Día 1	Día 2	Promedio	S	CV
Analista 1	22.93	22.45	25.71	2.8	10.96
	23.11	22.78			
	24.14	24.05			
	26.94	28.33			
Analista 2	26.81	29.80			
	27.04	30.24			



TABLA28

Pseudomona aeruginosa

	Día 1	Día 2	Promedio	S	CV
Analista 1	74.79	73.29	75.83	4.5	5.98
	75.60	70.43			
	75.60	68.81			
	82.77	74.55			
Analista 2	83.21	73.13			
	81.18	76.78			

CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

Todos los equipos estaban calibrado. (Ver anexo 9 Y 10)



CONCLUSIONES

La presente experimentación hace evidente que el método validado demuestra ser rápido, sencillo, teniendo la ventaja de ser cuali-cuantitativo para determinar la eficacia de los desinfectantes.

Las conclusiones que se derivan del presente trabajo denotan la importancia de la concentración del inóculo lo cual constituye un factor determinante, ya que la bacteria es utilizada como “reactivo” para la determinación cuantitativa del producto

De acuerdo a los resultados obtenidos se aprecia que la técnica analítica es reproducible, estableciendo que los parámetros seleccionados para el ensayo cumplen con los criterios para validación de métodos microbiológicos.



RECOMENDACIONES

1. Validar la aplicación de la técnica Dilución-Neutralización para todos los desinfectantes y antisépticos comercializados en el país.
2. Establecer una lista oficial de los neutralizantes específicos para cada desinfectante y antisépticos.
3. Garantizar el mantenimiento de las cepas utilizadas, según normas oficiales USP, European Pharmacopoeia, British Pharmacopoeia.
4. Asegurar que, áreas de trabajo, medios de cultivo, reactivos, y equipos, cumplan con las exigencias de las buenas prácticas de laboratorio vigentes.
5. Tomar en cuenta los errores aleatorios que se pueden presentar durante el ensayo.
6. Documentar y legalizar la técnica como requisito que deberán cumplir los desinfectantes y antisépticos para el registro en nuestro País.
7. Los medios de cultivo utilizados muestran que la presencia de agar puede marcar la actividad frente a la bacteria utilizada.



BIBLIOGRAFÍA

1- Asociación Española de Farmacéuticos de la industria. "Validación De Métodos Analíticos". Barcelona Marzo 2001.

Pág: 141-147.

2- BECTON-DICKINSON. Manual De BBL Productos Y Procedimientos de Laboratorio. 5ta edición,1988.

3- Ceil-Loeb."TRATADO DE MEDICINA INTERNA". 19va Edición. Mc Graw Hill.

Pág: 1849-1856.

4- Comité Nacional de Validación Dirección General de Control de Insumo para la Salud. SSA. Agosto 1990.

5- Jawetz, Melnick y Adelberg. "Microbiología Médica". 17 va edición.

Manual Moderno. 2002.

Pág: 243-245, 2669-277, 285-287.



6- Merck. "Manual De Medios De Cultivo." 1994.

Pág: 52-54, 64, 73-74, 88, 99,- 109, 117, 123-125, 144.

7-Nuevo Diario 28 de mayo 2001.

10 de mayo 2001

7 de marzo del 2000.

8- www.bilbo.edu.ey/~microbio/CONTROL.doc.

9-www.bilbo.edu.ey/~microbio/Pract.doc

10-www.infimed.sld.cu/instituciones/vats/vats/SEI/sei_1198.htm

11- [www.ugr.es/dptoprev/Hig.San.Amb.1.1-7\(2001\)](http://www.ugr.es/dptoprev/Hig.San.Amb.1.1-7(2001))

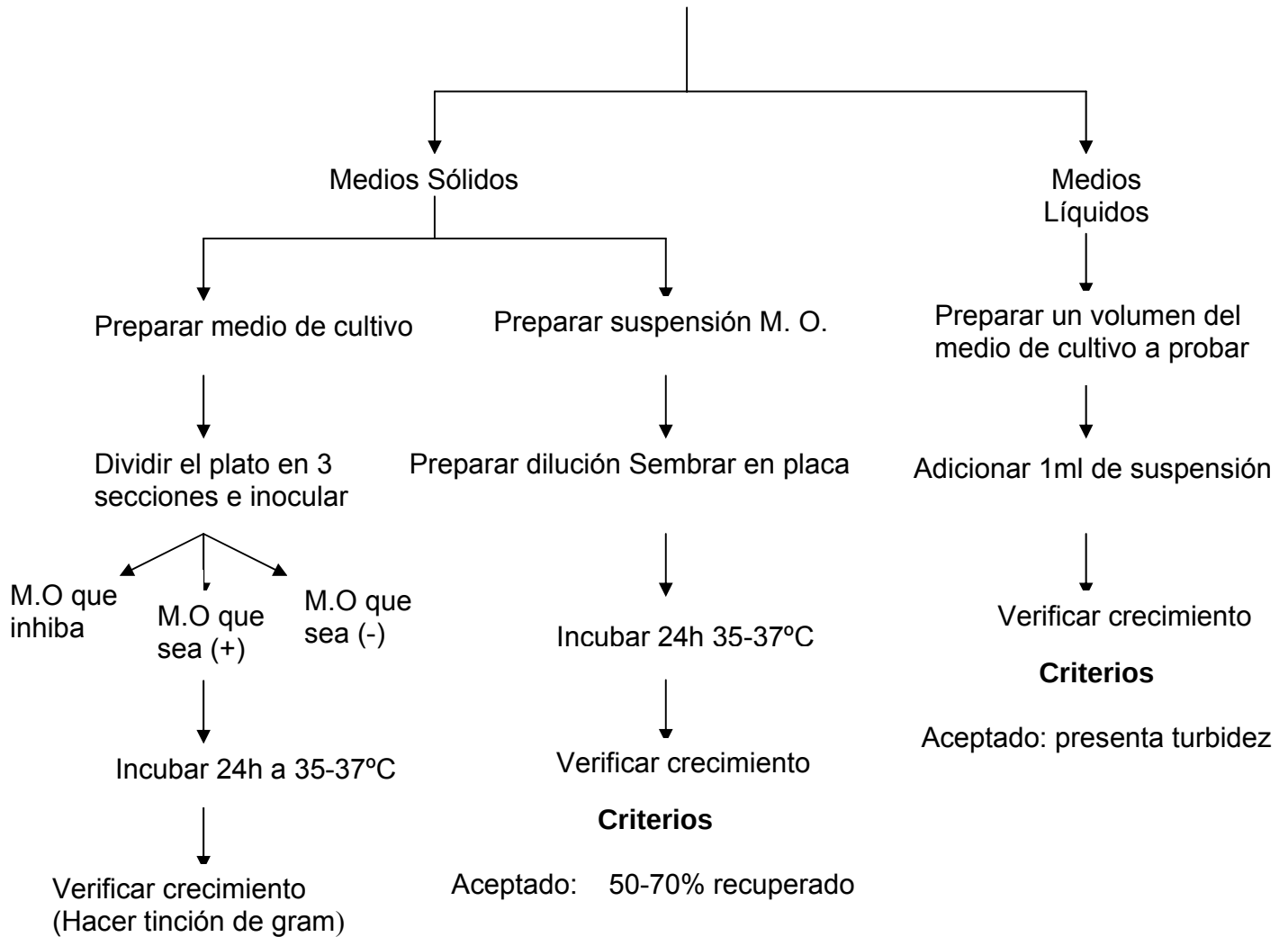
12- [www.urg.es/dptoprev/Hig.Sanid.Ambient.2:33-35\(2002\)](http://www.urg.es/dptoprev/Hig.Sanid.Ambient.2:33-35(2002))



ANEXOS



PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO



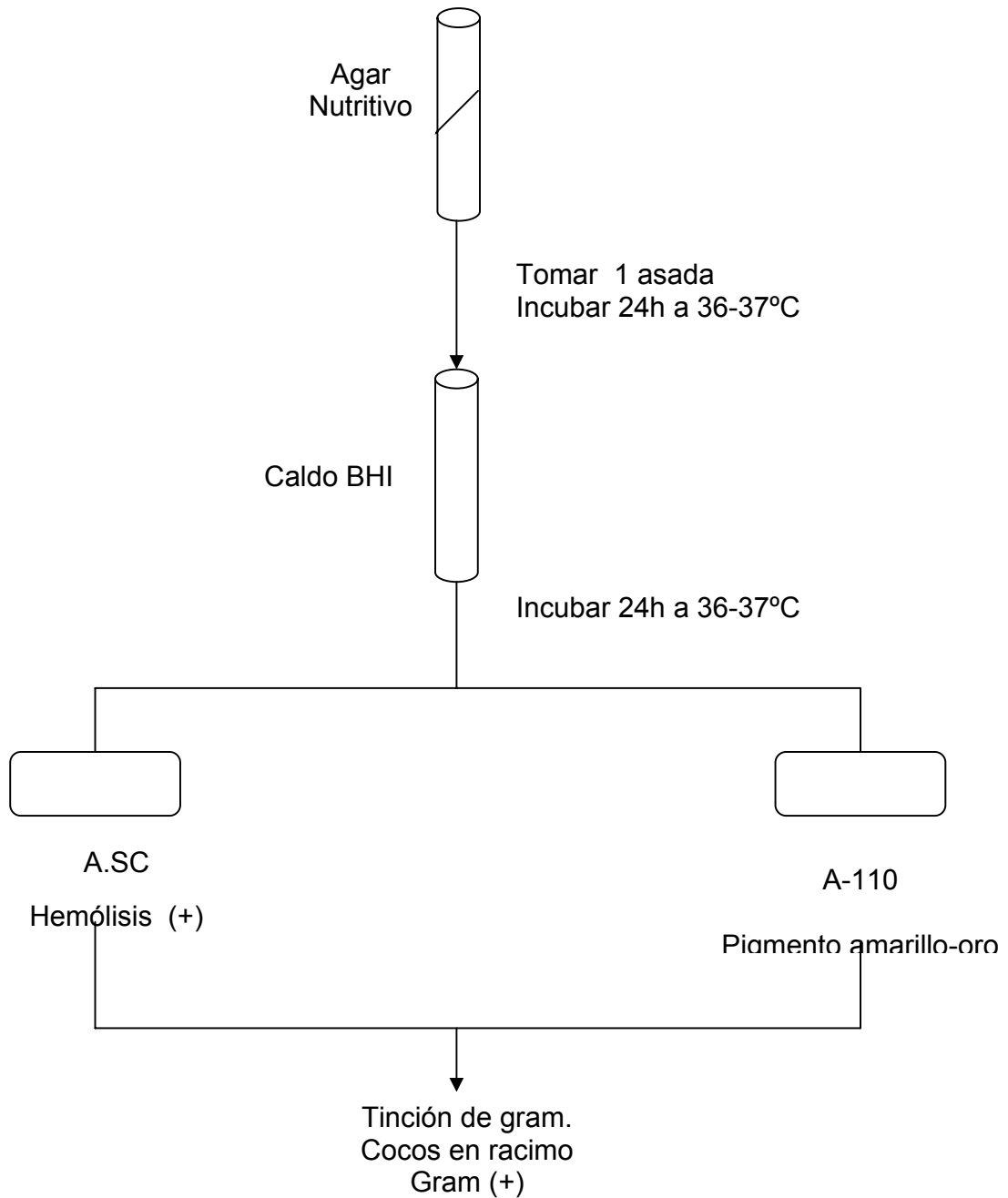
Criterios

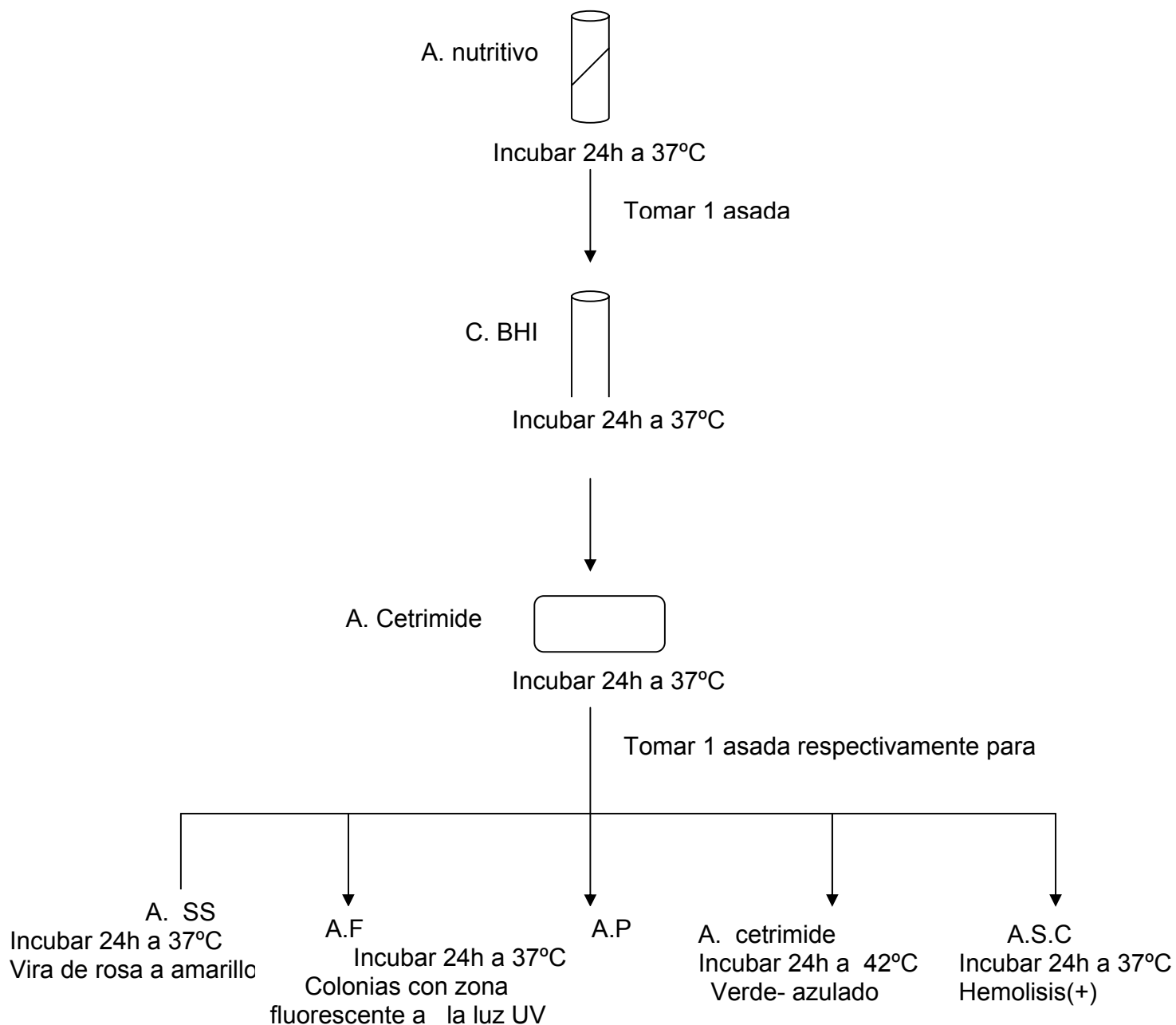
Rechazado: menor al 50-70% recuperado.
No hay crecimiento.
Hay crecimiento, pero no características.





CARACTERIZACION *Staphylococcus aureus*





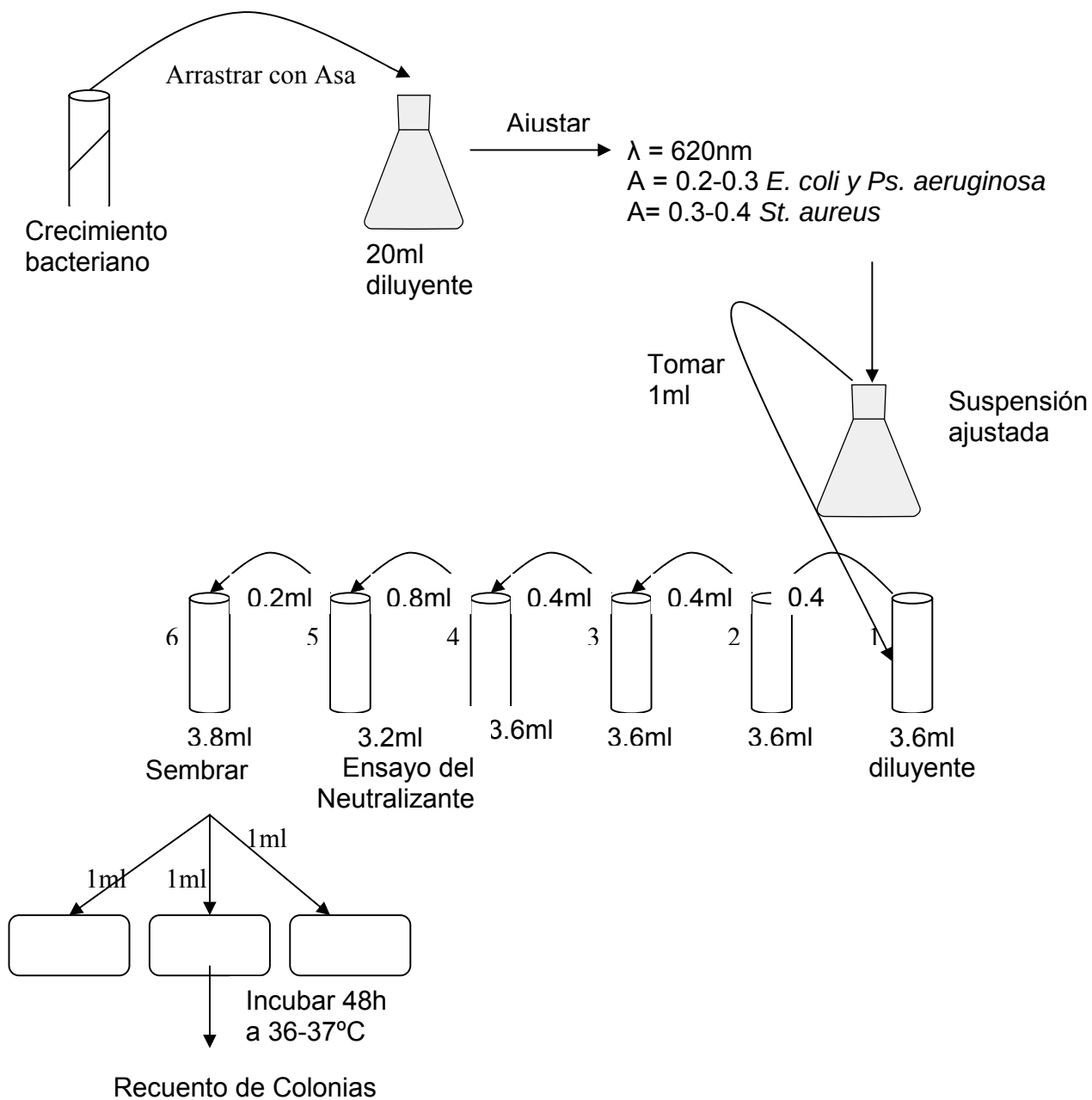


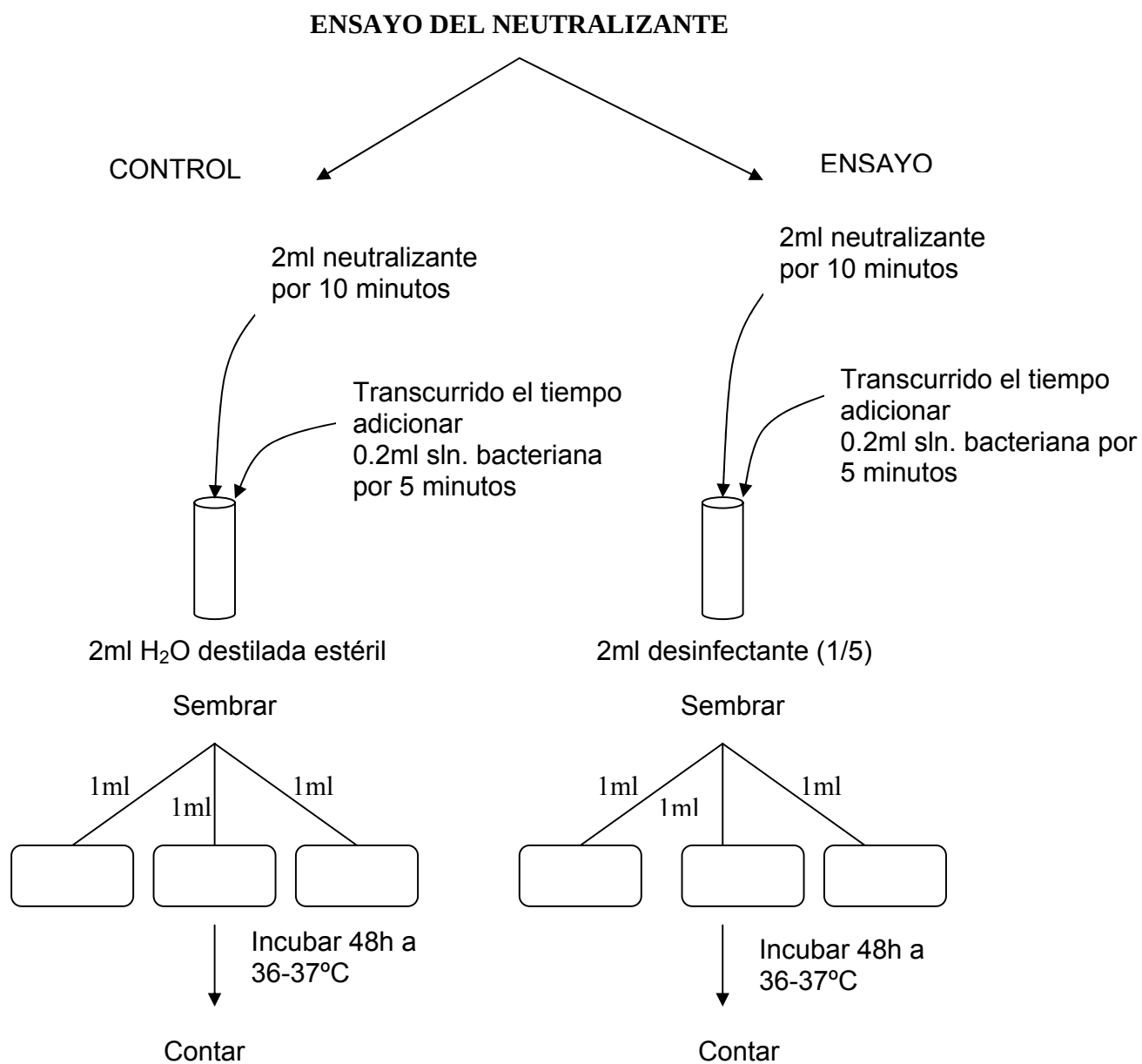
Original





SUSPENSIÓN BACTERIANA

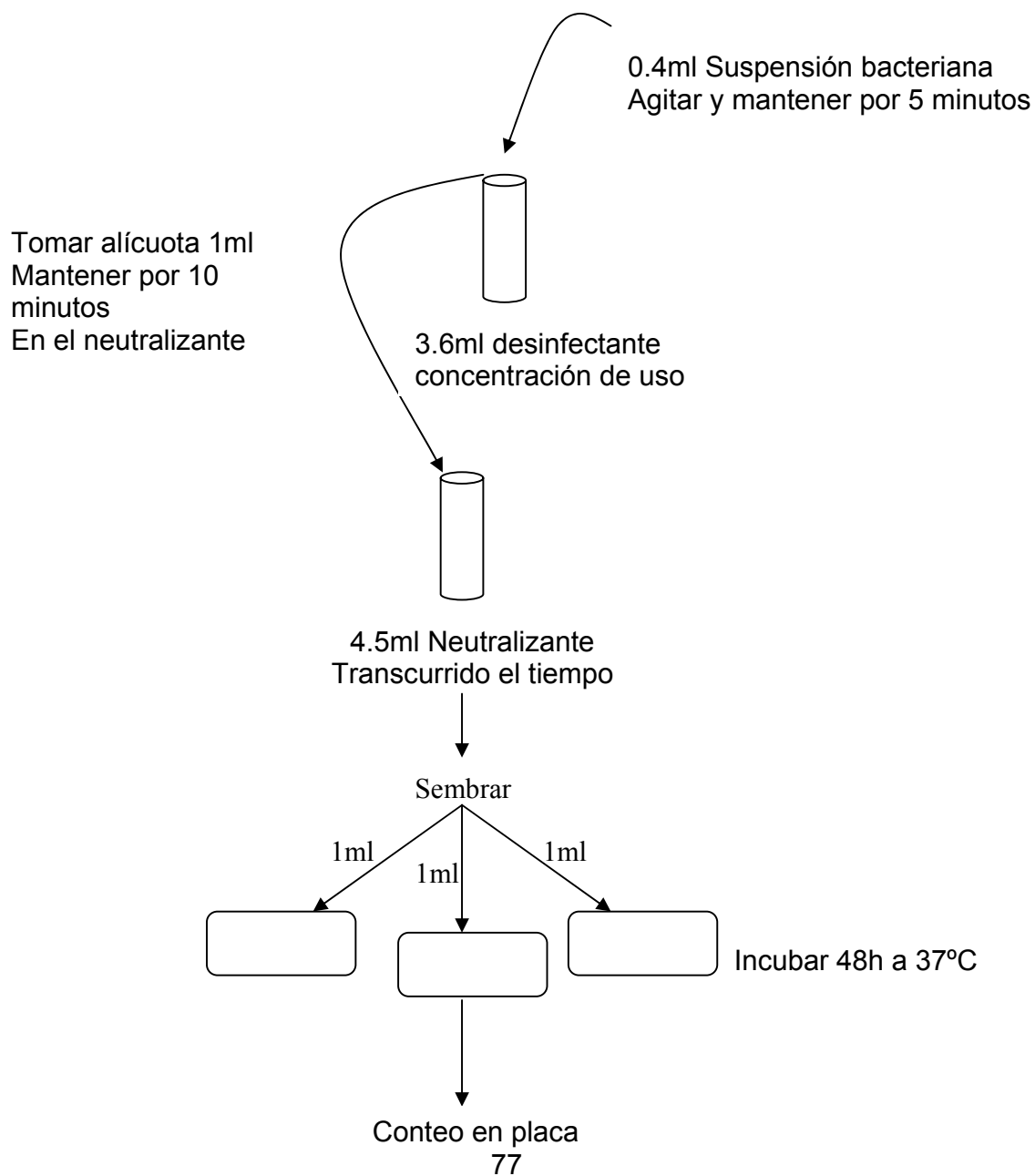






ANEXO 8

ENSAYO DEL DESINFECTANTE





Calibración Del Spectronic 20

12/18/2003

Tratamiento estadístico

λ 370 nm
0.8239
0.8239
0.8386
0.8386
0.8386
0.8239
0.8386
0.8239
0.8386
0.8386
0.8239
0.8386
0.8239
0.8386

Cálculos

Media	0.83068462
Desviación estándar	0.00762746
coeficiente de Variación	0.91821316

Especificacion:< 2%



ANEXO 10

Curva de calibración del Ph

pH vs Milivoltios

Fecha de calibración: 17/11/03

Fecha de cálculo : 18/11/03

Var - 1	Var - 2	Var - 3	Var - 4	Var - 5	Buffer	Promedio
180	185	180	185	185	4	183
0	0	0.1	0	0	7	0
-175	-170	-170	-170	-175	10	-172

* F/V de los Buffer

pH= 4

F/V= 30/04/04

L= 0C199231

pH= 7

F/V= 30/04/04

L= 0C199234

pH= 10

F/V= 30/04/04

L= 0C199236

pendiente -60

423.3333

intercepto 333

coef. -

Correlaci- 0.999871

ón 424

coef.

Determi- 0.999742

nación 864

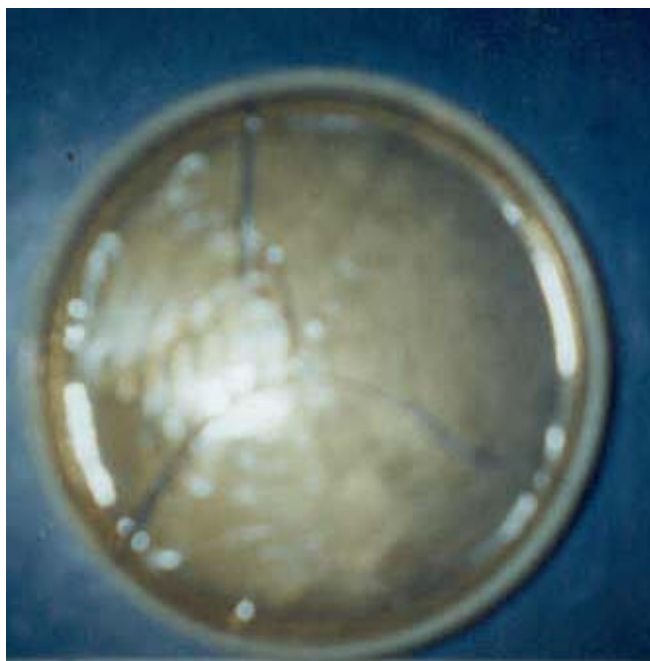
NOTA: calibración cada 6 meses.

Observación: Los buffer utilizados son de referencia de la Merck están vigente.



ANEXO 11
Promoción de crecimiento en agar 110

St. aureus



E. coli

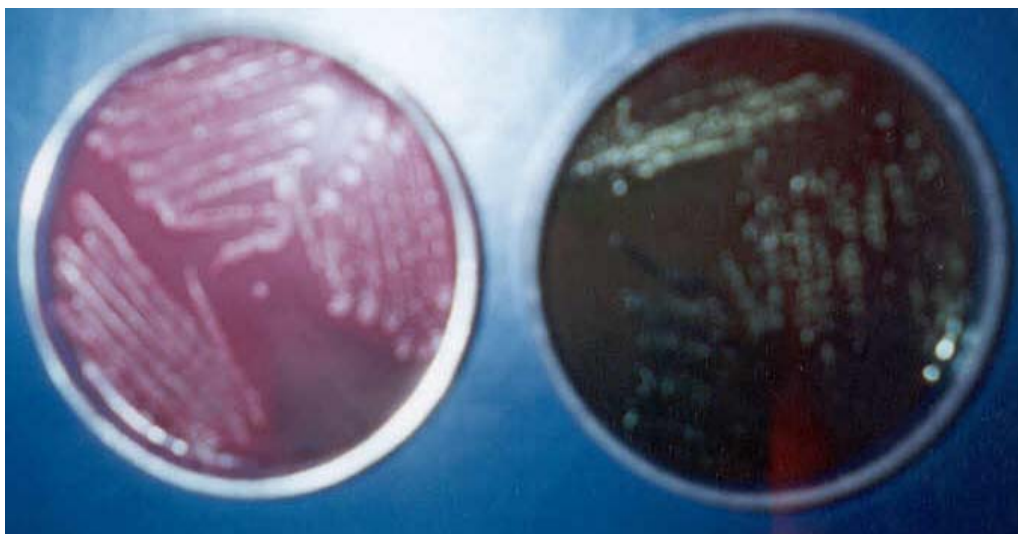
St. Epidermidis



ANEXO 12
Caracterización de *E. coli*

A. MK

A. EMB

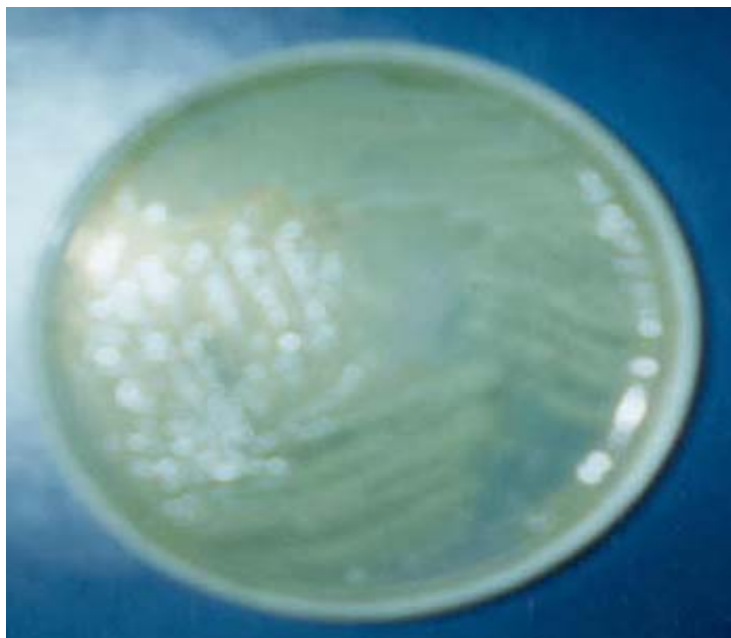




ANEXO 13
Caracterización de *Staphylococcus aureus*



ANEXO 14
Caracterización de *Pseudomona aeruginosa*





ANEXO 15
Escherichia coli

Control



Ensayo con el neutralizante C



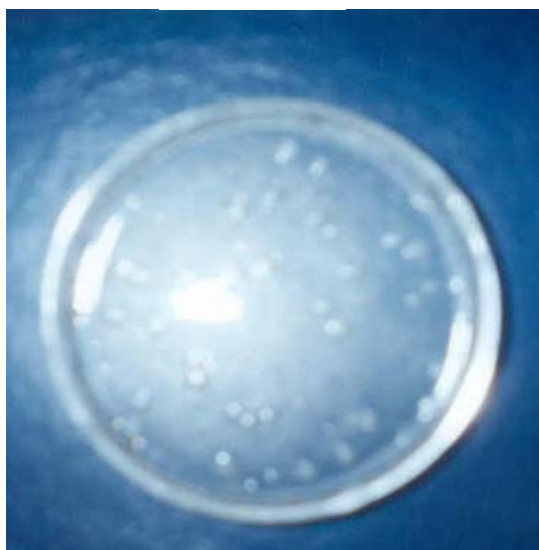
Ensayo con desinfectante





ANEXO 16
Staphylococcus aureus

Control



Ensayo con neutralizante C



Ensayo con Desinfectante





ANEXO 17
Pseudomona aeruginosa

Control



Ensayo con neutralizante c



Ensayo con desinfectante





GLOSARIO

Antisépticos: Producto que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos dentro o en tejidos vivos.

Bactericida: Propiedad mediante la cual un producto químico mata bacterias.

Bisfenoles: Se utilizan mucho en jabones antisépticos y enjuagues de manos. En general, muestran un espectro amplio de acción, aunque ejercen muy poca actividad contra *Pseudomonas* y mohos.

Calibración: Es parte de la cualificación y consiste en el ajuste interno del equipo, máquina e instrumento.

Cepa: Grupo de organismos intraespecífico que posee una o pocas características distintas; comúnmente estos organismos son homocigotos para estas características y las mismas se mantienen artificialmente con el propósito de demostración o para control de calidad de medicamentos.

Cultivo: Método para obtener el crecimiento de colonias de microorganismos.

Desinfectante: Producto utilizado para matar microorganismos en objeto o superficies.

Esterilización: Proceso químico o físico que destruye o remueve completamente todo tipo de vida microbiana, incluyendo esporas.

Inocular: Acción de introducir una cantidad de bacterias.

Inóculo: Suspensión de un cultivo puro de un determinado microorganismo (bacterias, hongos, levaduras), la cual debe de estar debidamente estandarizada, sea por método turbidimétricos, conteo directo u otros.

Muerte bacteriana: Pérdida irreversible de la capacidad para reproducirse de las bacterias.

Subcultivo: Resiembra de microorganismo a partir de un cultivo a un medio fresco estéril.



Sembrado en placa: Proceso donde las bacterias crecen sobre o dentro de medios sólidos y se encuentran inmóviles, donde cada una crece y da colonias aisladas.

Suspensión: Líquido en el cual se dispersan las bacterias.

Validación prospectiva: Es aquella que se realiza a técnicas nuevas.

