

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE PROTOCOLO DE VALIDACION PARA COMPROBAR
EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CLORHEXIDINA 4% Y
YODOPOVIDONA 10% EN LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL
MINISTERIO DE SALUD

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR

CARLOS JAVIER JUAREZ LOPEZ

WILLIAM ALEXANDER RAMOS RAMIREZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

M.Sc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

**ASESORES DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS.**

M.Sc. Rocio Ruano de Sandoval

M.Sc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

DOCENTE ASESOR

Lic. Edwin Eliú Alvanez Umaña

AGRADECIMIENTOS

A Dios, primeramente, por acompañarnos y guiado a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizaje, experiencias y sobre todo felicidad.

Agradecemos a todos los docentes de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, por ser nuestros consejeros y guías para culminar este proyecto con éxito.

Al Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud, por la apertura y confianza proporcionada para el desarrollo de la investigación y por facilitarnos los recursos y herramientas para su ejecución así también al área de análisis microbiológico y a los licenciados que forman parte del área, por su amistad y la confianza que depositaron en nosotros.

A nuestras Familias, por todo el apoyo que nos brindaron desde el inicio de nuestra formación y que hoy concluimos con satisfacción; por celebrar nuestros momentos de victoria y siempre estar ahí para alentarnos en las dificultades.

A nuestros asesores Lic. Edwin Eliú Alvarez Umaña y al Lic. Julio César Henríquez Pérez por la dedicación brindada en cada una de sus asesorías para completar este trabajo.

A nuestros amigos, por estar siempre en el momento justo.

DEDICATORIA

Agradecido primeramente con mi amado Dios porque gracias a él he culminado una etapa más en mi vida, porque siempre cuidó mis pasos y me guió en todos esos momentos difíciles, y ya que gracias a él puedo estar cumpliendo uno de mis sueños de llegar a ser un profesional en el área de la salud.

A mis amados padre y madre, mis dos mentores más importantes en mi vida, porque gracias al esfuerzo de ellos y por todo su apoyo incondicional que depositaron y siguen depositando en mí he logrado mi sueño de ser profesional. A mi mamita a mis tíos y tías y hermanas por darme siempre su apoyo y a incentivar me a seguir adelante en mi proceso de llegar a ser un profesional y a ser una buena persona.

A mi novia y a mis amigos por brindarme apoyo para seguir dando mi mejor esfuerzo y no rendirme en los momentos más difíciles, y por brindarme su amistad.

A cada uno de los docentes de la Facultad de Química y Farmacia por brindarnos todo ese conocimiento y que gracias a ellos he podido llegar a culminar mi carrera profesional.

A los Licenciados que forman parte del área de Análisis Microbiológico del Laboratorio de Control de Calidad del MINSAL por brindarnos su apoyo, amistad y por sus consejos en nuestro proceso de trabajo de grado.

A nuestros docentes asesores de tesis por su dedicación, esfuerzo como la ayuda que nos brindaron para poder culminar nuestro proceso de trabajo de grado.

Carlos Javier Juárez López

DEDICATORIA

Le doy gracias a Dios por haberme permitido culminar con éxito mi trabajo de grado. A mi madre Santos Lidia Ramírez de Ramos y mi padre Miguel Ángel Ramos, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por hacer de mí una mejor persona y por su paciencia ante las adversidades que se presentaron en este camino. Gracias por confiar siempre en mí.

A mis abuelos, hermanas y familiares que en todo momento demostraron su apoyo incondicional.

Compañeros, amigos de estudio y a todas las personas que me han apoyado compartiendo sus conocimientos.

Al Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos del Ministerio de Salud por brindar los recursos necesarios, compartir conocimientos y dar la confianza permitiendo desarrollar el trabajo de investigación.

Gracias a todos por rodearme de cariño y poder brindarles hoy con orgullo este título tan anhelado.

William Alexander Ramos Ramírez

INDICE GENERAL

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION xix

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO 24

3.1 Importancia de los desinfectantes y antisépticos 27

3.2 Antisépticos de uso hospitalario 28

3.3 Importancia de comprobar la eficacia de los antisepticos 33

3.3.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los antisépticos
y desinfectantes 33

3.3.2 Los microorganismos que la norma establece para comprobar
la eficacia son: 34

3.3.2.1 Staphylococcus aureus ATCC 6538. 34

3.3.2.2 Escherichia coli ATCC 11229. 34

3.4 Validación de métodos microbiológicos 35

3.4.1 ¿Qué es validar un método? 36

3.4.2 ¿Cuál es la diferencia entre validación y verificación? 37

3.4.3 ¿Por qué es necesario validar un método? 38

3.4.3.1 Desarrollo de métodos. 38

3.4.4 ¿Cuándo debe validarse o verificarse un método? 39

3.4.4.1 Validación de un método. 39

3.4.4.2 Verificación de un método. 39

3.4.5 Desarrollo de Protocolo de validación y el informe de
validación. 40

3.4.5.1 Contenido del protocolo de validación de métodos microbiológicos.	40
3.4.5.2 Contenido del informe de validación de métodos microbiológicos.	41
3.4.6 ¿Cómo evaluar un método?	42
3.4.7 Definición sobre método de ensayo.	43
3.4.7.1 Características de funcionamiento de los métodos validación.	45
3.4.8 Parámetros de validación según clasificación del método.	46
3.4.8.1 Métodos Cuantitativos.	46
3.4.8.2 Métodos Cualitativos	50
CAPITULO IV	
4.1 Tipo de estudio.	53
4.2 Investigacion bibliografica.	53
4.3 Campo de aplicación	54
4.4 Parte experimental	54
4.4.1 Recolección de muestra	54
4.4.2 Identificacion de la muestra	55
4.4.3 Preparativos para realizar metodología de efectividad antimicrobiana.	55
4.4.3.1 Preparación de soluciones.	55
4.4.3.2 Preparación de los medios de cultivo.	55
4.4.3.3 Preparación y acondicionamiento de cepas ATCC	55
4.5 Procedimientos para llevar a cabo la comprobación de efectividad antimicrobiana.	57
4.5.1 Preparación de la suspensión madre y estandarización de los microorganismos de prueba.	57
4.5.2 Determinación de la cuenta viable inicial de la suspensión estandarizada entre 3% y 5% de transmitancia.	58

4.5.3 Comprobación de la efectividad antimicrobiana de clorhexidina al 4% y yodopovidona al 10%	59
4.5.3.1 Determinación de células sobrevivientes.	59
4.5.3.2 Determinación del porcentaje de reducción.	60
4.5.3.2 Interpretación de resultados.	60
4.6 Protocolo de validacion para comprobar efectividad antimicrobiana.	61
4.6.1 Ecuaciones para calcular parámetros de validación	61
4.6.1.1 Fórmula para cálculo del porcentaje de repetibilidad	61
4.6.1.2 Fórmula para cálculo del porcentaje de reproducibilidad	62
4.6.1.3 Formula para cálculo de porcentaje de recuperación.	63
4.6.1.4 Formula para cálculo de sesgo.	63
4.6.2 Procedimiento de validación y tabulación de datos.	63
4.6.2.1 Dilución de muestra a 1:10 de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%	63
4.6.2.2 Estandarización de cepas de referencia y determinación de la cuenta viable (CV).	64
4.6.2.3 Determinación de eficacia antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%.	64
4.6.3 Parámetros de validación y criterios.	64
4.6.3.1 Parámetro de Repetibilidad.	64
4.6.3.2 Parámetro de Reproducibilidad.	66
4.6.3.3 Parámetro de Recuperación.	67
4.6.3.4 Parámetro de Sesgo	68
4.7 Informe de validacion.	70

CAPITULO V

5.0 Resultados y discusion de resultados.	72
5.1 Propuesta de protocolo de validacion.	73
5.2 Estandarización y determinación de cuenta viable inicial de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Escherichia coli ATCC 11229	88

5.3	Determinación de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 en diferentes tiempos de acción.	90
5.3.1	Efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 por analista.	91
5.3.2	Efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 por analista.	91
5.4	Cálculos de parámetros de estudio para clorhexidina 4%	92
5.4.1	Parámetro de repetibilidad para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	92
5.4.2	Parámetro de reproducibilidad para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	94
5.4.3	Parámetro de recuperación para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	96
5.4.4	Sesgo del ensayo de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	99
5.5	Determinación de efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 en diferentes tiempos de acción.	101
5.5.1	Efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 por analista.	103
5.5.2	Efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 por analista.	103
5.6	Cálculos de parámetros de estudio para yodopovidona 10%.	104

5.6.1	Parámetro de repetibilidad para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Escherichia coli ATCC 11229.	104
5.6.2	Resultados de reproducibilidad para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Escherichia coli ATCC 11229.	106
5.6.3	Parámetro de recuperación para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Escherichia coli ATCC 11229.	108
5.6.4	Sesgo del ensayo de Yodopovidona 10% en presencia de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Escherichia coli ATCC 11229.	110
5.7	Recopilación de parámetros de desempeño para clorhexidina 4% y yodopovidona 10%	112
5.7.1	Recopilación de resultados de parámetros de clorhexidina 4%.	113
5.7.2	Recopilación de resultados de parámetros de yodopovidona 10%	115
5.8	Informe de validación.	118
CAPITULO VI		
6.0	Conclusiones	153
CAPITULO VII		
7.0	Recomendaciones	156
Anexos		

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Esquema de resultados y discusión de resultados	72

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Criterios establecidos para la evaluación de métodos Microbiológicos cuantitativos.	49
2. Criterios establecidos para la evaluación de métodos Microbiológicos cualitativos.	51
3. Orden de análisis de cada muestra para repetibilidad.	65
4. Orden de análisis para reproducibilidad en analista 1.	66
5. Orden de análisis para reproducibilidad en analista 2.	66
6. Orden de análisis de cada muestra para sesgo.	69
7. Determinación de cuenta viable inicial de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	88
8. Determinación de cuenta viable inicial de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	89
9. Resumen de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	90
10. Parámetro de repetibilidad de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	93
11. Resumen de cálculo del parámetro de reproducibilidad de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	95

12. Resultados del % de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 por analista 1.	97
13. Resultados del porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 por analista 2.	98
14. Resultados de los ensayos para la determinación del parámetro de sesgo con muestra de clorhexidina 4% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 analista 1.	99
15. Resultados de los ensayos para la determinación del parámetro de sesgo con muestra de clorhexidina 4% en presencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 analista 2.	100
16. Resumen efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	102
17. Resultados del parámetro de repetibilidad de yodopovidona 10% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	104
18. Resumen de cálculos para parámetro de reproducibilidad de yodopovidona 10% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	106
19. Resultados para el cálculo del porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 analista 1.	108
20. Cálculo del porcentaje de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 por analista 2.	109
21. Resultados de sesgo para el ensayo de yodopovidona 10% en presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	110
22. Sesgo de los ensayos de yodopovidona 10% en presencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.	111

23. Resultados de parámetros de validación de clorhexidina 4%.	113
24. Resultados de parámetros de validación de yodopovidona 10%.	116

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Materiales y equipos, Preparación de soluciones y Medios de cultivo.
2. Etiqueta de Identificación de Muestras
3. Proceso para reanimación de cepas ATCC
4. Preparación de suspensión estandarizada
5. Verificación de viabilidad de microorganismos en la suspensión estandarizada entre 3% y 5% de transmitancia.
6. Metodología para comprobar efectividad antimicrobiana en antisépticos
7. Diseño de protocolo de validación
8. Diseño de informe de validación
9. Tabla N°25. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 1.
10. Tabla N°26. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 2.
11. Tabla N°27. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista 1.
12. Tabla N°28 Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista 2.
13. Tabla N°29 Cálculos del % de repetibilidad de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por analista 1.
14. Tabla N°30 Cálculos del % de repetibilidad de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista 2.
15. Tabla N°31. Cálculo del % de reproducibilidad de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

16. Tabla N°32. Cálculo del % de reproducibilidad de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC 11229.
17. Tabla N°33. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 bajo condiciones de prueba de clorhexidina 4% inactiva por analista 1.
18. Tabla N°34. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC11229 en presencia de clorhexidina 4% inactiva por analista 1.
19. Tabla N°35. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 bajo condiciones de prueba de clorhexidina 4% inactiva analista 2.
20. Tabla N°36. cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 11229 en presencia de clorhexidina 4% inactiva por analista 2.
21. Tabla N°37. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 1
22. Tabla N°38. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 2
23. Tabla N°39. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 analista 1
24. Tabla N°40. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 analista 2
25. Tabla N°41. Cálculos del % de repetibilidad de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 2
26. Tabla N°42. Cálculos del % de repetibilidad de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC 11229 analista 1
27. Tabla N°43. Cálculos del % de reproducibilidad de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATTCC 6538
28. Tabla N°44. Cálculos del % de reproducibilidad de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC 11229

29. Tabla N°45. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 1.
30. Tabla N°46. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 11229 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 1.
31. Tabla N°47. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 2.
32. Tabla N°48. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 11229 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 2.
33. Normativa Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999.
34. PO 9.4 Política para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos.

RESUMEN

El área de análisis microbiológico del Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud se encuentra en la mejora continua de ejecutar metodologías analíticas validadas para la verificación de la calidad de microbiológica de medicamentos e insumos médicos. Lograr la acreditación ante el Organismo Salvadoreño de Acreditación es parte de los objetivos del área, con esto se demostrara que los servicios brindados a la población son confiables y técnicamente competentes.

La propuesta del protocolo de validación surge con la necesidad de implementar una metodología que permita evaluar efectividad antimicrobiana en clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en el área de análisis microbiológico. El método se referencia en la normativa mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999. La validación del método se fundamentó en la política 9.4 publicada por el Organismo Salvadoreño de Acreditación. Se evaluó efectividad antimicrobiana de las muestras frente a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Estafilococos aureus* ATCC 6538 en tiempos de acción de 5s, 15s y 30s. Además, se determinaron parámetros de desempeño de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y sesgo descritos en el protocolo de validación.

Los resultados demuestran en el informe de validación que un tiempo de contacto de 30s en ambas muestras frente a los microorganismos de prueba es ideal para evaluar efectividad antimicrobiana al obtener una repetibilidad y reproducibilidad menor al 3%, una recuperación entre el 90%-110% y un sesgo menor a 0.3 log, dando cumplimiento a los criterios de aceptación. Por lo tanto, el método cumple con su fin previsto. Los analistas encargados de realizar ensayos en el área de análisis microbiológico deben dar cumplimiento a las directrices del protocolo de validación. El trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del área de Análisis Microbiológico de Medicamentos del Ministerio de Salud en los meses de Julio a Noviembre del 2022.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

El Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL) trabaja bajo la responsabilidad de determinar la calidad de los medicamentos que son usados por la red de establecimientos de salud del MINSAL, por lo tanto, las áreas por la que está conformado el Laboratorio de Control de Calidad: área de inspección y muestreo, análisis físico-químico y análisis microbiológico, deben de contar con las metodologías competentes y validadas para desarrollar los análisis y que los resultados emitidos sean satisfactorios y seguros para que los medicamentos sean liberados y de uso confiable a la población. Ante esto la investigación realizada tuvo como objetivo principal desarrollar una propuesta de validación para comprobar la efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% mediante la metodología la normativa mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 que titula, DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS, la cual contiene los diferentes elementos, procedimientos y criterio de aceptación tomados en cuenta para comprobar la actividad antimicrobiana en los tiempos de acción de 5, 15 y 30 segundos.

Es un aporte esencial ya que el área de microbiología del laboratorio de control de calidad contiene una alta demanda de análisis microbiológico de estos antisépticos, también porque como laboratorio de control de calidad hace uso de metodologías adecuadas y competentes ya que forma parte de las exigencias de la Normativa ISO 17025:2017 y que busca cumplir con el propósito de acreditar el área. La propuesta de validación es un protocolo el cual contiene parámetros de validación a la que fue sometida la metodología, como la repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y sesgo, basados en la política 9.4 que es para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación. El protocolo fue aplicado en el área de análisis microbiológico del laboratorio de control de calidad en el periodo

comprendido de julio-noviembre del año 2022, haciendo uso de los equipos y materiales que el laboratorio puso a disposición para la investigación.

Los resultados de porcentaje de reducción obtenidos en los diferentes tiempos de contacto fueron sometidos a los parámetros de validación, se evaluaron ambas muestras frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 donde se concluyó que para un tiempo de contacto de 30 segundos clorhexidina 4% y yodopovidona 10% cumplen los parámetros de validación así también los procedimientos descritos en la propuesta del protocolo de validación demuestran a través de evidencia objetiva y documentada que el método es óptimo para analizar la calidad de los antisépticos en el Laboratorio de Control de Calidad del MINSAL.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una propuesta de validación para comprobar la efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en laboratorio de control de calidad del ministerio de salud.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Proponer un protocolo de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%.
- 2.2.2 Evaluar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% utilizando la metodología establecida en la normativa NMX-BB-040-SCFI-1999 en diferentes tiempos de acción.
- 2.2.3 Determinar parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y sesgo, dados por la política 9.4 del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).
- 2.2.4 Elaborar un informe de resultados de la propuesta de validación.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

La piel representa una barrera notablemente eficaz contra las infecciones microbianas, es colonizada normalmente por un gran número de organismos que viven inofensivamente como comensales sobre la superficie cutánea. Cuando se produce una disrupción de la superficie de la piel, sea accidental o intencionalmente, el lecho de la herida o lesión puede verse invadida por bacterias autóctonas de la piel o no habituales en ella, comenzando así un proceso que puede derivar en una infección clínicamente establecida. ⁽¹⁾

Las infecciones siguen siendo un problema importante en todos los hospitales. ⁽²⁾ Las infecciones nosocomiales son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente. Las infecciones que ocurren más de 48 h después del ingreso suelen considerarse nosocomiales. ⁽³⁾ Las personas acuden a estos centros asistenciales por diferentes motivos ya sea por enfermedad, accidente o en el caso de las mujeres por un embarazo; hasta el punto de que muchos de estos casos pueden necesitar o no intervención quirúrgica para poder tratar dicha situación. Una intervención quirúrgica requiere de diferentes cuidados antes y después de ser realizada, también se conoce como cuidados pre-operatorios y post-operatorios, estos cuidados están relacionados a la buena antisepsia de la zona a tratar quirúrgicamente para evitar una infección nosocomial.

Es importante realizar una buena limpieza en las zonas a tratar ya que, según investigaciones, ⁽⁴⁾⁽⁵⁾ la infección de la herida quirúrgica (IHQ) es una de las principales complicaciones del paciente intervenido con cirugía y tiene graves consecuencias clínicas y económicas; la desinfección cutánea es uno de los elementos fundamentales para prevenir la aparición de la IHQ. La preparación del área quirúrgica hace referencia al tratamiento de la piel intacta previo a la incisión quirúrgica y que se realiza en el quirófano. Esta preparación incluye no

solo el área donde se realizará la incisión quirúrgica, sino que también se extiende a la zona de alrededor. La finalidad de este procedimiento es reducir la carga microbiana de la piel del paciente tanto como sea posible antes de romper la barrera cutánea. De hecho, la etiopatogenia de la IHQ implica con frecuencia a los microorganismos presentes en la piel, cuya entrada se produce en el momento de la incisión. ⁽⁴⁾

El paciente está expuesto a una gran variedad de microorganismos durante su hospitalización. La mayor frecuencia de pacientes con alta susceptibilidad a las infecciones, la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos, el aumento y complejidad en las intervenciones realizadas y la realización de multitud de procedimientos invasivos, hacen muy difícil su eliminación y reducción a cero. El contacto entre el paciente y un microorganismo, en sí, no produce necesariamente una enfermedad clínica, puesto que hay otros factores que influyen en la naturaleza y frecuencia de las infecciones nosocomiales, pero hay una gran cantidad de bacterias, virus, hongos y parásitos diferentes que las pueden causar. La infección por alguno de estos microorganismos puede ser transmitida por un objeto inanimado o por sustancias recién contaminadas provenientes de otro foco humano de infección (infección ambiental). La utilización de un máximo nivel de higiene en toda labor asistencial, es fundamental para reducir tanto la transmisión cruzada de toda aquella enfermedad infecciosa evitable, como toda infección nosocomial provocada por la misma. ⁽²⁾

También se debe tener en cuenta el proceso de la curación de la herida post-operatorio donde es importante la antisepsia ya que se controla, previene o elimina la infección, favoreciendo la cicatrización, también protege la herida de daños adicionales, protege la piel circundante de infecciones y traumatismos como también aporta mayor comodidad al paciente. ⁽⁵⁾

Los germicidas antimicrobianos son sustancias o mezclas de sustancias utilizadas para destruir o suprimir el crecimiento de microorganismos dañinos, tales como, bacterias, virus u hongos en los objetos y superficies inanimadas. Estos productos antimicrobianos contienen diferentes ingredientes activos y se comercializan en varias formulaciones: aerosoles, líquidos, polvos concentrados y gases. Dentro de este grupo, se encuentran los productos desinfectantes, los que contienen las sustancias químicas que destruyen o inactivan los microorganismos que causan infecciones. Los desinfectantes son de suma importancia en el control de infecciones en los lugares de trabajo y otros entornos de salud. La desinfección de instrumentos y superficies de los puestos de trabajo, donde se manipulen muestras biológicas, constituye la forma más adecuada de evitar el posible contagio. Esto se consigue con la correcta utilización de desinfectantes. El equipo de salud que trabaja en un establecimiento sanitario se encuentra expuesto a innumerables riesgos capaces de provocar alteraciones o patologías laborales y, los servicios que realizan procedimientos de desinfección no son una excepción constituyendo un área de trabajo que conlleva un riesgo laboral. ⁽⁶⁾

Los antisépticos son agentes químicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos en tejidos vivos de forma no selectiva, sin causar efectos lesivos importantes y que se usan fundamentalmente para disminuir el riesgo de infección en la piel intacta, mucosas y en heridas abiertas disminuyendo la colonización de la zona. El adecuado conocimiento de definiciones y normas de uso de antisépticos y desinfectantes, pone a disposición del trabajador del área de salud/ trabajador sanitario la herramienta esencial que le permite evitar la diseminación de agentes infecciosos a la vez que le proporciona las bases científicas para su uso racional. ⁽²⁾

3.1 IMPORTANCIA DE LOS DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS

Los conceptos de antiséptico y desinfectante son diferentes, pero es cierto que ambos términos se usan indistintamente de forma habitual. No obstante, conviene ser conscientes de las diferencias:

El antiséptico: es una sustancia que inhibe el crecimiento o destruye microorganismos sobre tejido vivo. ⁽⁷⁾

El desinfectante: es un compuesto que ejerce la misma acción (inhibir el crecimiento o destruir microorganismos) sobre superficies u objetos inanimados.

⁽⁷⁾

Por consiguiente, la misma sustancia puede ser utilizada como antiséptico o desinfectante, ya que el mecanismo germicida no varía según la superficie de aplicación. Un desinfectante es, además, un antiséptico sí no es irritante en el tejido a aplicar, no es inactivado por la materia orgánica y no produce toxicidad por absorción sistémica. ⁽⁷⁾

Los desinfectantes se usan a concentraciones que puedan tener efectos tóxicos o irritantes sobre los organismos vivos; por ellos, se utilizan sobre materiales y no deben emplearse sobre la piel y mucosas. De acuerdo con su origen etimológico, un antiséptico es un agente que impide la sepsis (o putrefacción) de los tejidos vivos; por ello, se emplean tópicamente en la prevención o tratamiento de infecciones, en las heridas o quemaduras con el objeto de prevenir la sepsis de los tejidos lesionados y, también, para evitar posibles infecciones en una intervención quirúrgica. Por tanto, los antisépticos actúan sobre la piel y las membranas mucosas a concentraciones que no comprometen la integridad de las células de los tejidos vivos. Ello quiere decir que el producto no debe ser absorbido por la piel o las mucosas ni presentar efectos tóxicos localmente. Además, un antiséptico debe actuar rápidamente y poseer un amplio espectro de acción que garantice la eliminación tanto de bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos o virus. Los antisépticos pueden ser las mismas

sustancias que las utilizadas para desinfectar, pero con la peculiaridad de que se usan a concentraciones más bajas. Además, hay que tener en cuenta que, al ser menos potentes que los desinfectantes, los antisépticos no deben usarse para desinfectar materiales inertes, tales como instrumentos, pinzas, tijeras, bisturís o guantes. ⁽⁸⁾

El uso de antisépticos como desinfectantes es de importancia ya que estos son utilizados para la desinfección preoperatoria de las manos del personal, lavado de manos en áreas críticas, lavado de heridas y quemaduras, el baño o ducha del paciente en el preoperatorio (paciente inmunocomprometido), desinfección de catéteres, tubos de hule y polietileno, limpieza de piel sana para procedimientos, curación de catéteres, sondas y vías, también desinfección de mordeduras de perro y otros animales. ⁽⁹⁾

3.2 ANTISEPTICOS DE USO HOSPITALARIO ⁽²⁾

– Alcohol Etílico:

Líquido incoloro y transparente con acción bactericida rápida (2 minutos), pero poco efecto residual. Presenta un inicio de acción retardado, motivo por el que hay que dejarlo actuar durante 2 minutos antes de cualquier procedimiento.

Su uso está indicado en la antisepsia previa a:

- Punciones venosas.
- Inyecciones subcutáneas.
- Inyecciones intradérmicas.
- Inyecciones intramusculares.
- Extracciones de sangre.

Es inflamable y su uso prolongado produce irritación y sequedad de la piel. No debe utilizarse sobre heridas porque irrita el tejido dañado y porque puede formar un coágulo que protege a las bacterias sobrevivientes. La

presentación adecuada de alcohol etílico para uso como antiséptico es de 70°.

– Clorhexidina:

Pertenece al grupo químico de las biguanidas (clorofenilbiguanida), que poseen actividad antimalárica. Antiséptico tópico y activo frente a un amplio espectro de microorganismos Gram+ y Gram-, algunos virus como el VIH y algunos hongos, pero sólo es esporicida a elevadas temperaturas. Reacciona con los grupos aniónicos de la superficie bacteriana, alterando la permeabilidad. La actividad antiséptica de la clorhexidina es superior a la de la povidona, del alcohol y el hexaclorofeno. Es un antiséptico tópico ideal, debido a su persistente actividad sobre la piel con el uso continuo, un efecto muy rápido y una mínima absorción, aunque se han asociado algunas reacciones alérgicas al tratamiento tópico con clorhexidina.

A bajas concentraciones, la clorhexidina exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida. Los siguientes microorganismos muestran una alta susceptibilidad a la clorhexidina: estreptococos, estafilococos, *Cándida albicans*, *Escherichia coli*, salmonellas, y bacterias anaeróbicas. Las cepas de Proteus, Pseudomonas, Klebsiella y cocos Gram- muestran una baja susceptibilidad a la clorhexidina. Los estudios clínicos han demostrado que no hay un aumento significativo de la resistencia bacteriana ni desarrollo de infecciones oportunistas durante el tratamiento a largo plazo con clorhexidina.

Es el antiséptico de elección para la inserción de catéteres y para realizar hemocultivos. También se utiliza para irrigaciones oculares, para la desinfección uretral y la lubricación de catéteres vesicales. Útil en irrigaciones pleurales, peritoneales o vesicales y para el lavado quirúrgico de las manos, para el baño preoperatorio y en antisepsia vaginal.

– Hexetidina:

Es un antiséptico con actividad antibacteriana sobre numerosos microorganismos (*Streptococcus*, *Lactobacillus*) y hongos (cándida) que se emplea como colutorio en diferentes patologías bucofaríngeas y odontológicas. La hexetidina posee efecto antibacteriano sobre *Candida albicans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. En cambio, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado ser relativamente resistentes a este antiséptico. Los lavados bucales con hexetidina disminuyen la disfagia resultante de alteraciones dolorosas de la boca, aceleran la cicatrización de heridas quirúrgicas y otras lesiones orales producidas por trauma o infección. Además, la hexetidina reduce o elimina la halitosis.

– Povidona Yodada:

Antiséptico de uso tópico de amplio espectro de actividad, que presenta la actividad microbicida del yodo elemental. La povidona yodada es activa frente a bacterias (Gram+ y Gram-), hongos, virus, protozoos, y esporas. El compuesto en sí es inactivo, pero lentamente va liberando yodo orgánico, que es el que posee la actividad bactericida. Su actividad frente a micobacterias es variable y a las concentraciones habituales de uso no es esporicida. Su actividad microbicida se mantiene en presencia de sangre, pus, suero y tejido necrótico por lo que mantiene su actividad en caso de infecciones en cavidades sépticas corporales como en pleura, peritoneo, hueso, vejiga.

Indicado para el lavado quirúrgico de manos y de zonas con vello, también para el lavado preoperatorio de pacientes y la desinfección de la piel sana del paciente antes de la cirugía. Se usa también en la antisepsia de la piel antes de inyecciones y extracciones de sangre y antes de la inserción de

catéteres. Indicado para el lavado quirúrgico de manos y de zonas con vello, también para el lavado preoperatorio de pacientes y desinfección de la piel sana del paciente antes de la cirugía. Indicado en la limpieza y desinfección de genitales antes de un cateterismo urinario y en la desinfección de pequeñas heridas, cortes superficiales, úlceras antes de la formación de costra. También para la desinfección de pequeñas quemaduras, según las diferentes asociaciones. Para desinfección vaginal y tratamiento de vaginitis inespecíficas y lavados vesicales.

– Peróxido De Hidrógeno:

Actúa como antiséptico y desinfectante de uso externo de corta duración y amplio espectro de acción, incluyendo gérmenes anaerobios. Se utiliza en solución acuosa al 3% sobre piel y heridas y al 1,5% sobre la mucosa bucal. En contacto con diversos catalizadores inorgánicos u orgánicos, tales como la enzima catalasa, presente en todos los tejidos, se descompone liberando oxígeno; así, dicha solución puede originar 10 veces su volumen de oxígeno y producir efervescencia, por lo que su mayor utilidad es como desbridante de heridas. Debido a la formación rápida de burbujas de oxígeno, el peróxido de hidrógeno produce efectos mecánicos de limpieza de restos de tejidos y para despegar las curas - gasas- de las heridas. Sin embargo, en cavidades cerradas, existe peligro de provocar lesiones tisulares y de producir embolia gaseosa. La acción del peróxido de hidrógeno se puede ver disminuida en presencia de materia orgánica (proteínas, sangre, pus). Su acción es bastante corta por lo que no se aconseja el empleo único del peróxido de hidrógeno como antiséptico.

– Polihexanida y Undecilenamidopropil Betaina:

La polihexanida consigue la eliminación de microorganismos gracias a un efecto fisicoquímico selectivo, de forma que los elimina sin interactuar con

las células propias del organismo, siendo ésta, una técnica segura y efectiva para la limpieza y descontaminación de heridas.

Indicaciones:

- Lavado, descontaminación y mantenimiento de las condiciones óptimas para la correcta cicatrización.
- Eliminar malos olores.
- Elevada capacidad tensoactiva.
- Excelente capacidad “detergente”.
- Buena tolerabilidad cutánea.
- No reseca la piel ni membranas mucosas.
- Buena tolerabilidad cutánea.
- No existe absorción.
- Sin riesgo de citotoxicidad.
- No reseca la piel ni membranas mucosas.

- Eosina:

Antiséptico tópico dermatológico indicado para la desinfección de la piel en infecciones cutáneas leves. No debe utilizarse en mucosas ni en heridas extensas y profundas. En niños menores de 30 meses se debe utilizar sólo bajo prescripción facultativa. Aunque es improbable la absorción sistémica, no debe utilizarse durante el embarazo o lactancia, salvo criterio médico. Debe evitarse la exposición al sol durante el tratamiento. Debe evitarse el empleo simultáneo o sucesivo del producto con otras soluciones de antisépticos de acción local. También es incompatible con agentes oxidantes o ácidos.

3.3 IMPORTANCIA DE COMPROBAR LA EFICACIA DE LOS ANTISEPTICOS

El comprobar la eficacia de estos germicidas garantiza los resultados de los análisis realizados por el Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud y le asegura al personal que hace uso de estos antisépticos y desinfectantes que son capaces de actuar contra microorganismos que pudiesen provocar un cuadro clínico más comprometedor y perjudicar el bienestar y salud del paciente, también así se puede detectar si existe algún tipo de resistencia a estos germicidas por parte de los microorganismos que pudiese hacer más difícil su eliminación.

El tener metodologías que garanticen y aseguren la eficacia de los antisépticos y desinfectantes también garantiza al Laboratorio De Control De Calidad emitir análisis de resultados satisfactorios y poder aprobar el uso de estos sabiendo que actuara conforme a lo indicado.

3.3.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes

La norma mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 que tiene como título MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS (Ver anexo N°15) cuenta con una metodología con la que se puede comprobar la actividad antimicrobiana de los antisépticos Clorhexidina 4% y Yodopovidona 10% la cual en su fundamento menciona que para la determinación de la actividad antimicrobiana, se plantea un solo método, éste se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específicas. ⁽¹⁰⁾

3.3.2 Los microorganismos que la norma establece para comprobar la eficacia son:

3.3.2.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Esta bacteria está clasificada como un coco Gram positivo que se agrupa en racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se describe que este microorganismo hace parte de la flora normal de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, este patógeno se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos, vasos sanguíneos), invasión a dispositivos médicos y también ha sido relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). ⁽¹¹⁾

Se ha descrito a *Staphylococcus aureus* como la principal causa de bacteriemia nosocomial en Norteamérica y Latinoamérica, y en Europa como la segunda causa de bacteriemia en hospitales. Aunque cualquier persona puede llegar a adquirir una infección por este microorganismo, hay algunos factores de riesgo en diferentes comunidades que son importantes; por ejemplo, los niños menores de dos años, diabéticos, pacientes con infecciones pulmonares recientes, o de piel, o que hayan sido sometidos a hemodiálisis o a una cirugía reciente, entre otras, incrementan la posibilidad de sufrir una infección por *Staphylococcus aureus*. ⁽¹¹⁾

Staphylococcus aureus es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbimortalidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario. ⁽¹²⁾

3.3.2.2 *Escherichia coli* ATCC 11229:

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas

después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos. ⁽¹³⁾

Las infecciones por bacterias *Escherichia coli* pueden provocar diarrea grave y sanguinolenta. En algunos casos, la infección puede conducir a graves problemas de salud. ⁽¹³⁾

La mayoría de las veces, *Escherichia coli* se contrae al comer un alimento que contiene este tipo de bacteria. Las bacterias también se pueden contagiar de una persona a otra al no lavarse las manos, al tocar superficies infectadas, al nadar en agua contaminada y al tocar animales en granjas o zoológicos interactivos. ⁽¹⁴⁾

El Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud MINSAL busca siempre garantizar la seguridad y veracidad de los análisis llevados a cabo, pero para ello se deben apoyar de metodologías validadas con las cuales se deben obtener resultados seguros y confiables que garanticen su validez, y es por eso que se debe conocer acerca de la validación de metodologías análisis.

3.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ⁽¹⁵⁾

El análisis microbiológico tiene importancia en distintos campos de actividades tales como salud pública, tecnología de alimentos y medio ambiente. En El Salvador los laboratorios encargados de llevar a cabo la evaluación microbiológica trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, tanto legal como social, que reclama un alto nivel de calidad y de confianza. Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, la veracidad de los resultados. Esto implica que, además de cumplir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, independientemente del laboratorio que los ejecute, esto incluye, pero no se limita a:

- Mediciones analíticas que satisfagan requerimientos acordados.
- Métodos y equipos que hayan sido probados para asegurar que son aptos para el propósito o fin previsto.
- Personal responsable de las mediciones que demuestre ser competente y calificado.
- Participación en programas de verificación externa de la competencia para asegurar que las mediciones analíticas realizadas en el laboratorio son consistentes a las que se realizan en otro lugar.
- Disposición de procedimientos bien definidos para el control y aseguramiento de la calidad y el uso de la información de control de calidad generada.

Dado que la validación de métodos es un requisito establecido en la norma ISO/IEC 17025:2017 se requiere homologar los conceptos a forma de que se establezcan criterios de trabajo en el campo de la validación de métodos microbiológicos que puedan ser usados por los laboratorios acreditados o que soliciten la acreditación, así como por los evaluadores de acuerdo a los lineamientos de la ISO/IEC 17025:2017 y las políticas de OSA.

3.4.1 ¿Qué es Validar un Método? ⁽¹⁶⁾

Validar un método es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método. Es importante la valoración de la idoneidad del método; en el pasado la validación del método se centraba solo en la evaluación de las características de desempeño.

Se incluyen tres definiciones de validación por documentos internacionales:

ISO 9000: Confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico o previsto.

ISO/IEC 17025: Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Vocabulario Internacional de metrología (VIM): Verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para su uso previsto.

Las actividades de validación de métodos y el desarrollo de métodos están estrechamente ligadas. Muchas de las características de desempeño que se evalúan durante la validación, también lo son en mayor o menor medida, durante el desarrollo del método. Sin embargo, es importante recordar que debe realizarse la validación formal de la versión final del método.

3.4.2 ¿Cuál es la diferencia entre validación y verificación? ⁽¹⁶⁾

La ISO 9000 define verificación como “confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados”. VIM establece que la verificación es “la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” y que validación es una “verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”.

Un laboratorio puede adoptar un procedimiento validado que, por ejemplo, ha sido publicado como una norma, o adquirir un sistema de medida completo y emplearlo para una aplicación específica a partir de un desarrollo comercial. En ambos casos el trabajo de validación básica se ha realizado, pero el laboratorio debe confirmar su capacidad para aplicar el método. Esta es la verificación. Esto implica que debe realizarse algún trabajo experimental para demostrar que el método funciona adecuadamente en el laboratorio. Sin embargo, la carga de trabajo es probable que sea considerablemente menor en comparación con la validación de un método que se ha desarrollado internamente.

3.4.3 ¿Por qué es necesario validar un método? ⁽¹⁶⁾

Importancia de la medición analítica. Millones de pruebas, mediciones y exámenes se hacen cada día en miles de laboratorios de todo el mundo. Hay innumerables razones que las sustentan, por ejemplo, para valorar bienes con fines comerciales; apoyar la asistencia sanitaria; controlar la calidad de agua potable, alimentos y piensos; analizar la composición elemental de una aleación para confirmar su idoneidad para su uso en la construcción de aviones; el análisis forense de los fluidos corporales en las investigaciones criminales. Prácticamente todos los aspectos de la sociedad se apoyan, de alguna manera, en el trabajo analítico.

El coste de llevar a cabo estas mediciones es alto y pueden surgir costes adicionales en base a las decisiones tomadas a partir de los resultados. Por ejemplo, los ensayos que demuestren que los alimentos son no aptos para el consumo pueden derivar en indemnizaciones por reclamación; los ensayos de controles de calidad que demuestran efectividad antimicrobiana frente a germinicidas pueden generar pérdidas para industrias que elaboran este tipo de producto al comprobar la ineficacia de ellos. Está claro que es importante hacer una correcta medición y ser capaz de demostrar que el resultado es correcto.

3.4.3.1 Desarrollo de métodos.

El trabajo de validación está precedido de una fase de desarrollo que incluye a diferentes miembros del personal y que puede realizarse de varias formas.

Por un lado, puede implicar la adaptación de un método ya existente realizando cambios menores para adecuarlo a una nueva aplicación.

Por otro lado, el químico analítico puede comenzar a esbozar algunas ideas y aplicar su conocimiento y experiencia para idear un método adecuado. Esto implica claramente mucho más trabajo y más dudas sobre la idoneidad del método final. No es inusual para el desarrollo del método trabajar con varias ideas simultáneamente antes de elegir finalmente la más adecuada. A pesar del

esfuerzo invertido en el desarrollo del método, no hay ninguna garantía de que el método vaya a funcionar adecuadamente durante la validación (o bajo condiciones de rutina en un laboratorio particular). Al implicar a diferente personal en la fase de desarrollo y de validación, se puede comprobar que las instrucciones (del procedimiento de medición) se entienden y se aplican.

3.4.4 ¿Cuándo debe validarse o verificarse un método? ⁽¹⁶⁾

3.4.4.1 Validación de un método.

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo, se indica en el apartado 5.4.5.2 de la Norma ISO/IEC 17025 que el laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados.
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio.
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación. La extensión ('alcance') de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar.

También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizados existente.

3.4.4.2 Verificación de un método.

Para los métodos normalizados, tales como los publicados por, ejemplo, ISO o American Society for Testing and Materials (ASTM), no es necesario validar el método utilizado por el laboratorio. Sin embargo, el laboratorio necesita verificar el desempeño del método como se detalla en la norma ISO/IEC 17025 apartado

5.4.2: El laboratorio debe confirmar que puede operar adecuadamente los métodos normalizados antes de introducir los ensayos o calibraciones.

También es necesaria la verificación cuando hay cambios importantes, como el uso de un equipo nuevo (pero similar), traslado de equipos, etc. En los laboratorios clínicos la mayor parte de los ensayos se realizan con procedimientos comerciales previamente validados por los fabricantes y que deben ser verificados por el usuario final. La ISO 15189 hace hincapié en que los procedimientos de examen usados sin modificaciones deben estar sujetos a una verificación independiente antes de ser usados como métodos de rutina. También puede tenerse en cuenta la actualización del software de un equipo, o cuando los resultados de control de calidad indica que el desempeño del método cambia con el tiempo.

3.4.5 Desarrollo de Protocolo de validación y el informe de validación ⁽¹⁶⁾

Tanto los trabajos de validación como la información de sus resultados se realizarán atendiendo a un procedimiento documentado. El esquema del protocolo de validación y el informe de la validación puede establecerse en guías sectoriales. Las Entidades Nacionales de Acreditación pueden establecer requisitos mínimos para esta documentación.

Para tal caso, el Organismo Salvadoreño de Acreditación de El Salvador, en su política 9.4 que lleva como título, Política para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos, brinda información sobre el contenido a desarrollar para realizar un protocolo de validación y así también el contenido para la elaboración del informe de validación.

3.4.5.1 Contenido del protocolo de validación de métodos microbiológicos. ⁽¹⁵⁾ (Ver Anexo N°7)

— Objetivo: Fin que se pretende con la realización de las actividades

- Alcance: delimitación de las actividades en cuanto al tipo de muestra, definición del método y su referencia, especificación. Se define el tiempo para realizar las actividades planificadas.
- Responsables: se definen los analistas, encargados de revisar los datos y autorizar el informe.
- Criterios de aceptación de los parámetros de mérito Parámetros en estudio: se especifica sobre cada una de las pruebas a realizar y los criterios.
- Se incluye aquí la incertidumbre si es que aplica.
- Equipos y materiales: Definir los insumos, equipo, reactivos, materiales de referencia y cualquier otro elemento a usa en las actividades
- Procedimiento: Detallar el procedimiento para cada una de las pruebas
- Algoritmos: Definir algoritmos de cálculo e incluir plantillas (si es que van a usarse).
- Evidencia de la revisión y aprobación del protocolo de actividades

3.4.5.2 Contenido del informe de validación de métodos microbiológicos. ⁽¹⁵⁾ (Ver anexo N°8)

- Objetivo: Fin que se pretende con la realización de las actividades
- Alcance: delimitación de las actividades en cuanto al tipo de muestra, definición del método y su referencia, especificación. Se define el tiempo para realizar las actividades planificadas.
- Responsables: se definen los analistas, encargados de revisar los datos y autorizar el informe.
- Equipos y materiales: Definir los insumos, equipo, reactivos, materiales de referencia y cualquier otro elemento a usa en las actividades
- Detalle de los resultados por prueba de acuerdo a lo planteado en el protocolo
- Cálculos y otros datos.

- Conclusiones: conclusiones por parámetro de estudio y una declaración sobre el resultado de la aptitud.
- Evidencia de la revisión y aprobación del informe de validación.

3.4.6 ¿Cómo evaluar un método? ⁽¹⁵⁾

Cada método de análisis debe evaluarse de acuerdo al diseño presentado en el protocolo de validación y demostrar que es adecuado para la o las matrices de interés.

Ejemplo de las diferentes áreas de análisis que deben demostrar que la metodología que implementan es adecuada para el uso previsto.

Análisis de alimentos: Dada la cantidad de matrices en las que los métodos pueden aplicarse se establece que los laboratorios deben demostrar competencia en los tipos o grupos de alimentos objeto del alcance de la acreditación. El laboratorio deberá demostrar la validación correspondiente por tipo de alimento en al menos 2 matrices. Ejemplo: Para contar con la acreditación de un determinado ensayo en Cárnicos crudos, el laboratorio deberá demostrar la validación en al menos 2 alimentos (carne de cerdo, carne de res, etc.). Cada vez que el laboratorio desee ampliar el ensayo en otro tipo de alimento, este deberá aplicar la validación correspondiente.

Análisis de agua: El laboratorio debe demostrar competencia en la realización del análisis en la matriz de interés de acuerdo a la clasificación y los valores permisibles que se señalan en las normas y reglamentos técnicos vigentes de acuerdo al tipo de agua. Para aquellas matrices de las que no se dispone de una norma deben justificarse los criterios de validación en función al uso propuesto. Deben revisarse los lineamientos para la validación y el control de calidad de los ensayos que están contenidos en las referencias de los mismos.

Análisis de medicamentos y materias primas: Prevalecen los lineamientos proporcionados para la validación de acuerdo a la referencia del ensayo (USP,

BP, FEUM, entre otros). Debe en todo caso demostrarse la competencia, según lo definido en la referencia, para realizar el análisis a forma de asegurar el resultado de acuerdo a la especificación farmacopeica.

De acuerdo a lo mencionado se puede comprender lo indispensable y necesario que es para cada área el contar con ensayos validados ya que es así como pueden demostrar competencia y desde el punto de vista social también se está aportando a la población un mayor grado de seguridad. Los antisépticos y desinfectantes de igual manera son de carácter relevante y es por eso que deben demostrar que la metodología con la cual fueron analizados es competente, según como se define en las normativas y políticas de referencia

3.4.7 Definición sobre método de ensayo. ⁽¹⁵⁾

La norma ISO IEC ISO/IEC 17025:2017 en su apartado 5.4.2 establece que “El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”. Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su validación.

La norma establece que “cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante de equipos”. Por tanto, en el caso de elegir un procedimiento de ensayo interno, es recomendable que se parta de métodos de referencia que sean ampliamente aceptados, conocidos y aplicados en el sector.

Así pues, debido al marco en que se ubica la aplicación y uso de los ensayos microbiológicos, se podría establecer la siguiente clasificación de métodos, atendiendo al nivel de confianza que aportan y que, por tanto, marcarán el nivel de información adicional que el OSA requerirá relativa a su validez:

Tipo I: Métodos normalizados. Son métodos desarrollados por un organismo de normalización o por otras organizaciones bien establecidas, cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión (ILAC G 18) (Ejemplo: ISO, NMKL, UNE EN, AOAC, APHA, USP, entre otros)”.

Un método normalizado ha sido exhaustivamente estudiado y describe de forma clara y exacta las condiciones de realización del ensayo. Sus características de funcionamiento deben ser acordes con el uso previsto. Estos métodos normalizados son considerados métodos de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación (ISO 16140).

Tipo II: Métodos alternativos. Métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado (ej. ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994 etc.) y son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia.

Tipo III: Métodos basados en métodos de referencia. Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica.

Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se fundamentan.

En cualquier caso, se consideran modificaciones técnicas respecto del método de referencia, aquellas que pongan en cuestión su validez técnica, como, por ejemplo, cambios relevantes en un medio de cultivo, cambios en las condiciones de incubación (tiempo/temperatura), etc.

Tipo IV: Otros métodos. Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte (un fabricante o proveedor de equipos, de

medios de cultivo etc.), y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia o de los métodos alternativos.

Como parte de los procedimientos de ensayo, se deben incluir también los procedimientos para la preparación de las muestras en relación con el alcance solicitado, pues se trata de un aspecto crítico en determinados alcances (ej.: alimentos). Existen normas reconocidas que regulan la manipulación previa de los objetos de ensayo (ej. serie de normas ISO 6887, UNE-EN ISO 8261) y que deben ser consideradas como una referencia adecuada.

3.4.7.1 Características de funcionamiento de los métodos validación. ⁽¹⁵⁾

Los métodos de ensayo presentados para su acreditación deben estar validados. Para ello, es necesario conocer las características de funcionamiento del método. Por otra parte, la extensión de las actividades de validación a realizar por el laboratorio dependerá del tipo de método seleccionado:

Métodos Normalizados (Tipo I) Los métodos normalizados entendidos como de referencia no requieren una validación completa. El laboratorio debe, tal y como establece la norma ISO/IEC 17025:2017 “confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos”.

Métodos alternativos (Tipo II). A efectos de validación, los métodos alternativos se tratarán como los métodos de referencia. No obstante, para que OSA entienda que un método se puede considerar como método alternativo deberá disponer de evidencias de su validación. En caso de que dichas evidencias no estén disponibles será responsabilidad del laboratorio solicitante el aportarlas.

Métodos basados en métodos de referencia (Tipo III). Los métodos basados en métodos de referencia no precisan de una validación completa. No obstante, el Laboratorio deberá realizar la necesaria comprobación de su funcionamiento.

Comprobación de la Aplicación correcta de métodos Tipo I, II y III. El laboratorio debe justificar la selección del número y tipo de matrices en función del alcance de acreditación y ésta debería basarse en la información tomada de referencias bibliográficas o estándares internacionales (ej.: Anexo B de ISO 16140, ISO/TS 19036).

Otros métodos (Tipo IV) La norma ISO/IEC 17025:2017 en su apartado 5.4.2 establece que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados y los métodos que diseña o desarrolla para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. Por tanto, para este tipo de métodos, el laboratorio deberá evaluar su idoneidad para su ámbito de aplicación, así como las actividades necesarias a realizar para garantizar su validez técnica. En este sentido las actividades en los apartados 7.31, 7.3.2 y 7.3.3 de este documento, se han considerado como válidas para asegurar la adecuación al uso, pero no permiten garantizar de forma completa la validez de los métodos definidos como Tipo IV ni su caracterización ya que éstas deben estar fundamentadas en referencias válidas (ej.: ISO 16140, ISO /TR 13843, UNE- EN ISO 1799). Por lo tanto, el Laboratorio deberá disponer de evidencias completas de que los métodos han sido validados de forma adecuada.

3.4.8 Parámetros de validación según clasificación del método. ⁽¹⁵⁾

Se presentan a continuación características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en el caso de métodos de referencia, alternativos y basados en métodos de referencia teniendo en cuenta la naturaleza del método.

3.4.8.1 Métodos Cuantitativos.

Tener en cuenta que, para cada uno de los parámetros acá definidos y sus respectivas especificaciones (ver tabla N°1), prevalece lo establecido en los métodos de referencia utilizados para cada uno de los métodos.

- Repetibilidad:

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

$$r_{\cdot\cdot} = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\%r_{\cdot\cdot} = r * 100$$

$$\%r_{\cdot\cdot} = \frac{S}{\bar{X}}$$

Donde:

r: Repetibilidad

DSR: Desviación Estándar Relativa

S: Desviación estándar

\bar{X} : Promedio

Nota: Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

- Reproducibilidad:

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad.

$$R_{\cdot\cdot} = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\%R_{\cdot\cdot} = R * 100$$

Donde:

R: Reproducibilidad

DSR: Deviación Estándar Relativa

Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

- Recuperación.

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Media del logaritmo del recuento} * 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

- Sesgo.

Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de los resultados (x) del método candidato con un valor de referencia adecuado (x_{ref}).

Cálculo:

La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es $< 0.3 \log$

$$\text{Sesgo} = X_{recuperado} - X_{inoculado} \quad (\text{Ecuación 4})$$

- Incertidumbre.

Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

(Ecuación 5)

$$SR = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{jA} - y_{jB})^2}{2}}$$

Donde:

SR: Desviación Estándar de Reproducibilidad.

y, i, j: Son los datos transformados a logaritmos, en log 10 (UFC/g) o log10 (UFC/ml)

i: Es el índice de la muestra, i:1 n (n>10)

j: Es el índice de la condición de reproducibilidad, j=A o B.

El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado.

Tabla N°1. Criterios establecidos para la evaluación de métodos microbiológicos cuantitativos. (15)

Parámetro	Criterio de aceptación	
	Muestras no contaminadas	Muestras contaminadas naturalmente
Repetibilidad	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis. Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación del método. El límite de repetibilidad debe ser menor al 3%	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis. Nivel de fortificación: No aplica. El límite de repetibilidad debe ser menor al 3%
Reproducibilidad	Número de repeticiones: no menos de seis analistas. Mínimo 2 analistas. Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación. R < 3%	Número de repeticiones: no menos de seis por analista. Nivel de fortificación: No aplica. R < 3%
Recuperación	Número de repeticiones: al menos 6 porciones de muestra por cada analista. Tipo de muestra: solo muestras no contaminadas. El nivel de fortificación al menos uno y se espera una recuperación entre el 90-110% log.	

	La verificación del inóculo puede realizarse durante la ejecución del ensayo por sextuplicado. Nota: en algunos casos puede requerirse más de un nivel de fortificación de acuerdo al rango de trabajo del método.
Sesgo	Número de repeticiones: por lo menos 6 Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas. Número de analistas: uno Nivel de fortificación: por lo menos uno (medio)
Incertidumbre	Se considera una referencia adecuada las pautas establecidas en el documento técnico ISO/TS 19036:2006.

3.4.8.2 Métodos Cualitativos

- Límite de detección:

La estimación del límite de detección requiere del empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos.

El propio intervalo de confianza a estos bajos niveles hace que, desde un punto de vista estadístico, no se pueda conocer de forma exacta si un determinado inóculo contiene o no el microorganismo a detectar. Por tanto, es aceptable comprobar el método con bajos niveles de inóculos de microorganismos diana de forma que se evalúen diferencias entre las distintas matrices, analistas, equipos etc., verificándose la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles a estos niveles. Se definen criterios de aceptación para la evaluación de métodos microbiológicos cualitativos que declaran el cumplimiento de los parámetros establecidos. (ver tabla N° 2)

Tabla N°2. Criterios establecidos para la evaluación de métodos microbiológicos cualitativos. (15)

Parámetros	Criterio de aceptación
Verificación del tamaño del inóculo.	Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos seis veces, en promedio se obtienen cuentas de menos de 10 UFC* y ninguna de 10 UFC o más.
Verificación de la muestra.	Número de repeticiones: 3 Analistas: uno Resultados positivos: 0%
Verificación del límite de detección.	Número de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: al menos dos Resultados positivos: al menos el 80% Tamaño del inóculo: menos de 10 UFC
Falsos positivos	Número de repeticiones: al menos 6 por analista. Analistas: al menos dos Resultados positivos verdaderos: 100% Falso positivo: 0% Tamaño del inóculo: más de 100 UFC
Incertidumbre	No aplica para métodos cualitativos

* Preferentemente menores o iguales a 5 UFC

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

- Estudio experimental: El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador donde se desarrolló el proceso de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%, las muestras de análisis fueron proporcionadas por el área de inspección y muestreo, los resultados fueron obtenidos a través de ensayos y pruebas en el área de análisis microbiológico; la metodología aplicada está referenciada en la normativa NMX-BB-040-SCFI-1999, consiste en la comprobación de efectividad antimicrobiana de germicidas frente a cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. Los ensayos realizados servirán para la propuesta de validación de la metodología empleada.
- Estudio transversal: Se estableció un periodo para desarrollar la metodología de estudio, comprendido del mes de julio a noviembre del año 2022, mediante la experimentación y descripción de los resultados obtenidos en el análisis microbiológico.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

La revisión bibliográfica se realizó en las siguientes fuentes:

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Consorcio de Bibliotecas Universitarias de El Salvador (CBUES)
- Repositorio Institucional de la Universidad de El Salvador
- Portal Regional de la Biblioteca Virtual en Salud (BVS)
- Internet

4.3 CAMPO DE APLICACIÓN

La parte experimental fue llevada a cabo dentro del área de análisis microbiológico del Laboratorio de Control de Calidad del MINSAL el cual cuenta con el equipo e indumentaria necesaria que estuvo a la disposición del estudiante para realizar los procedimientos necesarios para las determinaciones de los ensayos como también las condiciones ambientales ideales para la obtención de resultados satisfactorios. Los materiales, equipos y reactivos utilizados deben ser adecuados, cristalería certificada para laboratorios de ensayo, equipos con calibraciones vigentes, los microorganismos de prueba utilizados calidad ATCC con disposición de cinco pasajes de la cepa de referencia, cristalería e insumo debidamente esterilizados en autoclave.

Para llevar a cabo la validación de los antisépticos, el área de Inspección y Muestreo proporciono al área de Análisis Microbiológico las muestras de Clorhexidina 4% y Yodopovidona 10% que fueron recolectadas mediante un muestreo por atributos y que fueron estas las asignadas para realizar la investigación.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

Materiales, equipos y reactivos. (Ver anexo N° 1)

4.4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Las muestras fueron asignadas por parte del área de inspección y muestreo del Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud. El área es la encargada de recibir y registrar las muestras provenientes de compras del MINSAL ⁽¹⁷⁾, FOSALUD y las que proceden de la venta del servicio de análisis físico-químico y microbiológico, las muestras ingresan al laboratorio para su respectivo análisis. Además, mantienen el control de estabilidad física de las muestras a condiciones de temperatura y humedad relativa controladas en su bodega de retención.

Los procedimientos de recolección de muestras y la identificación realizada por la institución, fueron catalogados como confidenciales en el presente estudio.

4.4.2 IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Para identificación de las muestras se asignaron únicamente códigos alfanuméricos, nombres genéricos y concentraciones. Se propuso un formato para etiquetado de muestras en las que la clorhexidina 4% se le atribuye el código: MC42022 y a la yodopovidona 10% el código: MY102022. (Ver anexo 2)

Por acuerdos de confidencialidad entre el Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador y el solicitante de análisis, solo se detallará código de muestra y nombre genérico de muestras, sin detallar información adicional.

4.4.3 PREPARATIVOS PARA REALIZAR METODOLOGÍA DE EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

4.4.3.1 Preparación de soluciones. (Ver anexo N°1) *

- Solución salina estéril 0.9%
- Agua estéril

4.4.3.2 Preparación de los medios de cultivo.

Medios de cultivo deshidratados. (Ver anexo N°1) *

- Agar Triptona-Soja (TSA)
- Caldo Dey-Engley neutralizante

4.4.3.3 Preparación y acondicionamiento de cepas ATCC

Microorganismos de prueba (2).

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 11229

*(Los medios de cultivos y soluciones se prepararon de acuerdo a los procedimientos internos del área de Análisis Microbiológico).

4.4.3.3.1 Reanimación de cepas de referencia.

- Dejar que la bolsa del pellet sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abrir la bolsa rasgando a la altura del corte y quite la unidad del pellet.
- Retirar la porción de la etiqueta, rasgar y colocar a la placa de cultivo principal o al registro de control de calidad. No desarmar el dispositivo durante la hidratación.
- Sobre el borde de la mesa de trabajo, agrietar la ampolla en la parte superior del pellet (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- Mantener de forma vertical y golpear suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- Apretar la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- De inmediato, saturar el hisopo abundantemente con el material hidratado y transferir al medio con agar correspondiente
- Inocular la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- Descartar el pellet de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- De inmediato, incubar la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.
- Ver anexo N°3.

4.4.3.3.2 Conservación de microorganismos de prueba: ⁽¹⁰⁾

- Tomar crecimiento microbiano de la placa inoculada con la unidad del pellet con un hisopo completamente estéril.

- Estriar en tres placas de agar TSA e incubar 24h a una temperatura de 30 a 35 °C
- Adicionar 5 mL de caldo CASOY a cada una de las placas incubadas con ayuda de una micropipeta P1000
- Adicionar perlas de ebullición para facilitar el arrastre de microorganismos a un beaker de 100 mL completamente estéril que contendrá la suspensión madre de microorganismos.
- Tomar de la suspensión madre 850 μ L y agregar 150 μ L de glicerina estéril para crear un medio crioprotector.
- Rotular cada uno de los crioviales con el número de ATCC que lo identifica y agitar para homogeneizar la suspensión.
- Depositar en un rack y almacenar en el ultracongelador a una temperatura de -40 a -80°C

4.5 PROCEDIMIENTOS PARA LLEVAR A CABO LA COMPROBACIÓN DE EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA ⁽¹⁰⁾.

4.5.1 Preparación de la suspensión madre y estandarización de los microorganismos de prueba.

- Tomar del ultracongelador los microorganismos de prueba que se van a utilizar.
- Ambientar crioviales que contienen las cepas ATCC hasta descongelar completamente.
- Tomar con un hisopo estéril suspensión de microorganismos y estriar completamente en una placa con agar TSA e incubar 24h a una temperatura de 30 a 35 °C.
- Tomar crecimiento microbiano de la placa y estriar otras 3 placas con agar TSA, incubar a una temperatura de 30 a 35°C por 24 h.

- Adicionar 5 mL de caldo CASOY a cada una de las placas incubadas con ayuda de una micropipeta P1000.
- Adicionar perlas de ebullición para facilitar el arrastre de microorganismos.
- Transferir a un beaker de 100 mL completamente estéril la suspensión de microorganismos.
- Transferir 1000 μ L de suspensión de microorganismos a un tubo con 9.0 mL de caldo CASOY.
- Ajustar blanco con caldo CASOY a un 100% de transmitancia y no interfiera en la estandarización de la bacteria.
- Ajustar %transmitancia de suspensión madre a una longitud de onda de 580 nm hasta llegar a una lectura entre 3% y 5% de transmitancia.
- Determinar en la suspensión el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / mL) y precisar el porcentaje de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125 X 10⁸ UFC/mL.
- Ver anexo N°4

4.5.2 Determinación de la cuenta viable inicial de la suspensión estandarizada entre 3% y 5% de transmitancia ⁽¹⁰⁾.

- Efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una entre 25 y 250 UFC.
- Transferir 1 mL de la suspensión de microorganismos de prueba estandarizada a un erlenmeyer que contenga 99 mL de solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril (dilución 1:100 o 10⁻²)
- Hacer tres diluciones 1:100 adicionales de manera secuencial (10⁻⁴, 10⁻⁶, y 10⁻⁸) y luego hacer una dilución 1:10 para llegar a la dilución 10⁻⁹
- Colocar en placas de petri estériles 1 mL de cada dilución por duplicado.
- Agregar a cada placa un volumen de 20 mL aproximadamente de agar TSA.

- Homogeneizar y dejar solidificar, invertir las cajas de petri e incubar durante 48 h a una temperatura entre 30 a 35°C.
- Realizar conteo de UFC luego del debido tiempo de incubación con ayuda del cuenta colonias.
- Ver anexo N°5

4.5.3 Comprobación de la efectividad antimicrobiana de clorhexidina al 4% y yodopovidona al 10%

4.5.3.1 Determinación de células sobrevivientes ⁽¹⁰⁾. (Ver Anexo N° 6)

- Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir exactamente y por duplicado 99 mL del producto o su dilución, transferir a matraces erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca estériles.
- Agitar los matraces, suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que, en el momento de la misma, aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo.
- Inocular en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.
- Agitar el matraz con la muestra inoculada y exactamente en los tiempos de: 5s, 15s y 30s tomar 1.0 mL con micropipeta p1000
- Transferir la cantidad tomada a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de caldo neutralizante y mezclar.
- Transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles y continuar diluyendo hasta tener las diluciones necesarias para obtener placas que contengan de 25 a 250 colonias.
- Agregar a cada placa de 20 mL del medio agar TSA con neutralizante, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 48 h entre 30 a 35°C.

- Después del período de incubación, contar el número de UFC en las placas.
- Ver anexo N°6.

4.5.3.2 Determinación del porcentaje de reducción. ⁽¹⁰⁾

Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

S: Células sobrevivientes (UFC/mL)

C.V.: Cuenta viable inicial

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto.

4.5.3.2 Interpretación de resultados ⁽¹⁰⁾.

Un producto etiquetado como germicida, debe tener un porcentaje de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 5s, 15s y 30s y de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125 X 10⁸ UFC / mL.

4.6 PROTOCOLO DE VALIDACION PARA COMPROBAR EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA. (Ver anexo N°7)

La propuesta de validación implementada para comprobar efectividad antimicrobiana tomó en cuenta los parámetros recomendados para la validación de métodos microbiológicos cuantitativos dados por el Organismo Salvadoreño de Acreditación en su Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos (PO 9.4) ⁽¹⁵⁾.

El método está basado en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Por lo tanto, se considera de tipo I, es decir, que el laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos, como lo establece la norma ISO/IEC 17025:2017.

Tener en cuenta que, para cada uno de los parámetros definidos y sus respectivas especificaciones prevalece lo establecido en los métodos de referencia utilizados para cada uno de los métodos.

4.6.1 Ecuaciones para calcular parámetros de validación

4.6.1.1 Fórmula para cálculo del porcentaje de repetibilidad ⁽¹⁵⁾

$$\%r = r * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$r = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR^2}{2}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$DSR = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(Xi-\bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

%r: Porcentaje de repetibilidad

r: Repetibilidad en términos de desviación

DSR: Desviación estándar relativa de los valores obtenidos

n: Indica el número de ensayos realizados

S: Desviación estándar de los valores obtenidos

\bar{X} : Promedio de los resultados

Xi : Valores individuales de cada ensayo.

4.6.1.2 Fórmula para cálculo del porcentaje de reproducibilidad ⁽¹⁵⁾

$$R = 2.8 \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{2}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\%R = R * 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

R: Indica reproducibilidad en términos de desviación

DSR₁: Desviación estándar relativa del analista 1

DSR₂: Desviación estándar relativa del analista 2

%R: Porcentaje de reproducibilidad entre los valores obtenidos por cada analista.

4.6.1.3 Formula para cálculo de porcentaje de recuperación ⁽¹⁵⁾.

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Media del logaritmo del recuento} * 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

% de Recuperación: Indica la capacidad de recuperación del microorganismo bajo condiciones de prueba específicas.

Media del logaritmo del recuento: Indica el promedio de los microorganismos recuperados en el ensayo de recuperación.

Logaritmo de las UFC inoculadas: Concentración inicial de microorganismos inoculados en la prueba.

4.6.1.4 Formula para cálculo de sesgo ⁽¹⁵⁾.

$$\text{Sesgo} = /X_{\text{recuperado}} - X_{\text{inoculado}}/ \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde:

Sesgo: Indica la diferencia absoluta entre los microorganismos recuperados y los inoculados inicialmente.

4.6.2 Procedimiento de validación y tabulación de datos.

4.6.2.1 Dilución de muestra a 1:10 de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%

- Medir exactamente 10 mL de muestra con una jeringa de 20mL estéril, transferir a un matraz de 250 mL con tapón de rosca estériles.
- Medir con una probeta 90 mL de agua destilada estéril y transferir al matraz con la muestra para obtener una dilución 1:10.

- Agitar hasta homogenizar completamente la muestra con el cuidado de no formar demasiada espuma.
- Extraer 1 mL de muestra del matraz y depositarlo en un descarte *
- Repetir el procedimiento para completar 6 matraces con muestra diluida.

4.6.2.2 Estandarización de cepas de referencia y determinación de la cuenta viable (CV) ⁽¹⁰⁾ (Ver Anexo N° 4 y Anexo N° 5)

- Determinar la cuenta viable inicial de suspensiones estandarizadas para cada uno de los microorganismos de referencia empleados, según el apartado 4.5.1 y 4.5.2.
- Tabular los resultados obtenidos.

4.6.2.3 Determinación de eficacia antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%. (Ver Anexo N° 6)

- Tomar un matraz erlenmeyer con muestra diluida como se describe en el apartado 4.6.2.1.
- Realizar el procedimiento descrito en el apartado 4.5.3.1. para la determinación.

4.6.3 Parámetros de validación y criterios. ⁽¹⁵⁾

Los parámetros y criterios de aceptación serán aplicados con respecto al % de reducción de la metodología de efectividad antimicrobiana.

4.6.3.1 Parámetro de Repetibilidad.

Para la realización y cumplimiento del parámetro se siguieron las especificaciones dadas.

- Realizado por un analista.
- Su criterio de aceptación debe ser un límite de repetibilidad $< 3\%$ ⁽¹⁵⁾.

- Debe realizar la cantidad de 6 ensayos con cada una de las muestras y los microorganismos en el orden que se presenta a continuación:

Tabla N° 3. Orden de análisis de cada muestra para repetibilidad.
(Fuente: Elaboración propia)

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Documentar los resultados de cada una de las determinaciones del porcentaje de reducción con cada una de las muestras en presencia de cada microorganismo por separado en los tiempos de 5s 15s y 30s, siguiendo cada uno de los procedimientos siguientes:

4.6.3.1.1 Ensayo de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 para comprobar repetibilidad.

- Tomar un matraz erlenmeyer con la muestra diluida como se muestra en el apartado 4.6.2.1.
- Realizar el procedimiento descrito en el apartado 4.5.3.1. para la determinación. (Ver Anexo N° 6)
- Realizar y documentar los cálculos de la determinación del porcentaje de reducción con los datos obtenidos de cada ensayo realizado para clorhexidina 4% y yodopovidona 10% (Anexos N°9 al N°12 para clorhexidina 4%; y Anexos N°21 al N°24 para yodopovidona 10%)
- Documentar los porcentajes de reducción obtenidos de todos los ensayos para realizar los cálculos correspondientes (Anexos N°13 al N°14 para clorhexidina 4% y Anexos N°25 al N°26 para yodopovidona 10%)

- Determinar si se cumple con el criterio de aceptación que el parámetro de repetibilidad establece. (Ver Tabla N°10 para Clorhexidina 4% y Tabla N°17 para yodopovidona 10%)

4.6.3.2 Parámetro de Reproducibilidad.

Para la realización y cumplimiento del parámetro se seguirán las especificaciones dadas para este.

- Realizado por dos analistas.
- El criterio de aceptación debe ser una reproducibilidad de $R < 3\%$.
- Deben realizar la cantidad de 6 ensayos con cada una de las muestras y los microorganismos en el siguiente orden:

Tabla N°4. Orden de análisis para reproducibilidad en analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Analista 1:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Tabla N°5. Orden de análisis para reproducibilidad en analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Analista 2:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Documentar los resultados de cada una de las determinaciones del porcentaje de reducción con cada una de las muestras en presencia de cada microorganismo en los tiempos de 5s 15s y 30s, siguiendo cada uno de los procedimientos siguientes:

4.6.3.2.1 Ensayo de efectividad antimicrobiana de Clorhexidina 4% y Yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 para comprobar reproducibilidad.

- Tomar un matraz erlenmeyer con muestra diluida como se describe en el apartado 4.6.2.1.
- Realizar el procedimiento descrito en el apartado 4.5.3.1. para la determinación. (Ver Anexo N° 6)

Realizar y documentar los cálculos de la determinación del porcentaje de reducción con los datos obtenidos de cada ensayo realizado para clorhexidina 4% y yodopovidona 10% (Anexos N°9 al N°12 para clorhexidina 4%; y Anexos N°21 al N°24 para yodopovidona 10%), luego documentar los porcentajes de reducción obtenidos de todos los ensayos para realizar los cálculos correspondientes (Anexos N°15 al N°16 para clorhexidina 4% y Anexos N°27 al N°28 para yodopovidona 10%) y determinar si se cumple con el criterio de aceptación que se establece para el parámetro de reproducibilidad. (Ver Tabla N°11 para Clorhexidina 4% y Tabla N°18 para yodopovidona 10%)

4.6.3.3 Parámetro de Recuperación.

Para la realización y cumplimiento del parámetro se siguieron las especificaciones dadas:

- Se tomaron al menos 6 porciones de muestra por cada analista.
- Su criterio de aceptación a cumplir es una recuperación entre el 90-110 % $\log_{(3)}$
- Cada microorganismo se puso en contacto en presencia de cada una de las porciones de muestras por separado.

Determinación de la recuperación de los microorganismos en presencia de cada muestra.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

- *Escherichia coli* ATCC 11229

Procedimiento:

- Tomar 6 tubos conteniendo 9 mL de caldo neutralizante
- Tomar las 6 porciones de muestra diluida según el apartado 4.6.2.1 en alícuotas de 1 mL y depositarlas en cada uno de los tubos con neutralizante.
- Agitar con vortex cada uno de los tubos hasta su completa homogeneización.
- Inocular cada uno de los tubos con 0.1 mL de la dilución de microorganismos con la C.V. del apartado 4.5.2.
- Agitar en vortex cada uno de los tubos con las porciones de muestras.
- Colocar en placas estériles 1 ml de cada uno de los tubos por duplicado.
- Agregar por vertido en placa aproximadamente 20 mL de agar TSA, homogeneizar y dejar solidificar posteriormente se debe incubar a una temperatura de 35°C por 48 h.
- Realizar el conteo de las colonias recuperadas con ayuda de un equipo de cuenta colonias.
- Reportar los resultados de los recuentos.

Reportar los datos obtenidos (Ver anexo N° 17 al N°20 para clorhexidina 4% y Anexos N°29 al N°32 para yodopovidona 10%) y realizar los cálculos para muestra y microorganismos y determinar si se cumple con el criterio de aceptación que el parámetro establece. (Ver Tabla N°12, Tabla N°13 para clorhexidina 4% y Tabla N°19, Tabla N°20 para yodopovidona 10%)

4.6.3.4 Parámetro de Sesgo

Para la realización y cumplimiento del parámetro se siguieron las especificaciones dadas para este.

- Lo realizó únicamente un analista.

- Su criterio de aceptación: La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es $< 0.3 \log$. ⁽¹⁵⁾
- Fueron realizados 6 ensayos de recuperación con cada una de las muestras con los microorganismos de prueba como se presenta a continuación:

Tabla N°6. Orden de análisis de cada muestra para sesgo. (Fuente: Elaboración propia)

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Procedimiento:

- Tomar las 6 porciones de muestra diluida según el apartado 4.6.2.1 en alícuotas de 1mL y depositarlas en cada uno de los tubos con neutralizante.
- Agitar con vortex cada uno de los tubos hasta su completa homogeneización.
- Inocular cada uno de los tubos con 0.1 mL de la dilución de microorganismos con la C.V. del apartado 4.5.2.
- Agitar en vortex cada uno de los tubos con las porciones de muestras.
- Colocar en placas estériles 1 ml de cada uno de los tubos por duplicado.
- Agregar por vertido en placa aproximadamente 20 mL de agar TSA, homogeneizar y dejar solidificar posteriormente se debe incubar a una temperatura de 35°C por 48 h.
- Realizar el conteo de las colonias recuperadas con ayuda de un equipo de cuenta colonias.
- Repetir el procedimiento por sextuplicado.
- Reportar los resultados

Reportar los resultados y realizar los cálculos para determinar si se cumple con el criterio de aceptación con cada microorganismo en presencia de cada muestra.

(Ver Tabla N° 14 y Tabla N°15 para Clorhexidina 4%; Tabla 21 y Tabla N°22 para yodopovidona 10%)

4.7 INFORME DE VALIDACION. (Ver Anexo N° 8)

El informe de validación contendrá la evidencia de todos aquellos resultados obtenidos a partir de la ejecución de los procedimientos planteados para la determinación de los parámetros de validación contenidos en el protocolo de validación y que se llevaron a cabo para validar la metodología para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

Los Resultados y Discusión de los Resultados fueron clasificados tal como se muestra en el siguiente esquema para una mejor comprensión.

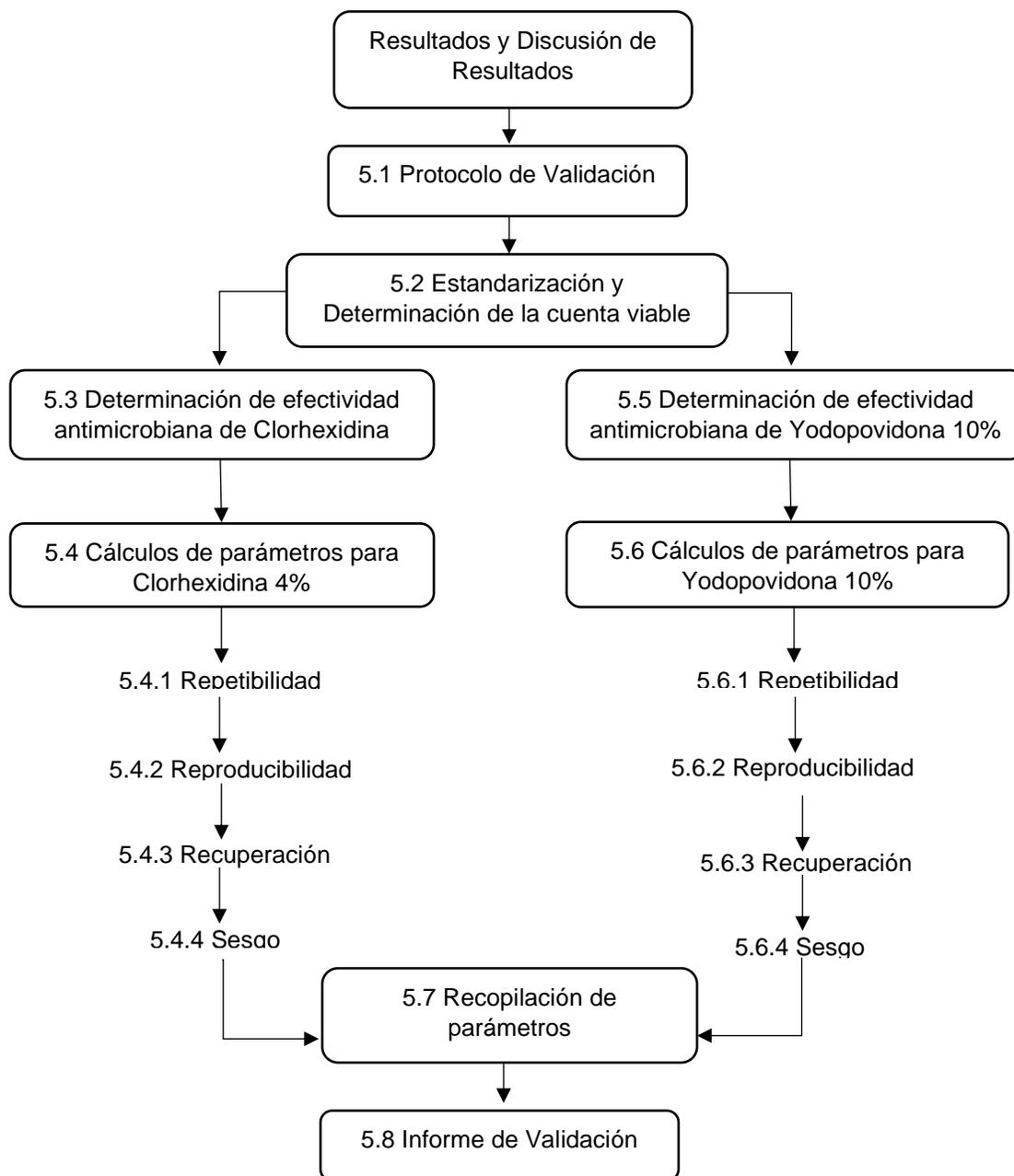


Figura N°1. Esquema de resultados y discusión de resultados.
(Fuente: Elaboración propia)

5.1 PROPUESTA DE PROTOCOLO DE VALIDACION

Logo	PROPUESTA DE PROTOCOLO DE VALIDACION PARA COMPROBAR LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CLORHEXIDINA 4% Y YODOPOVIDONA 10%.	Fecha: xx-xx-xx
	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD Área de Análisis Microbiológico	Página – de -
Objetivo		
Demostrar a través de parámetros de validación que el análisis de los antisépticos clorhexidina 4% y yodopovidona 10% cumplen con su uso previsto por medio de una metodología para comprobar la efectividad antimicrobiana en productos germicidas.		
Alcance		
Comprobar experimentalmente la eficacia antimicrobiana de los antisépticos de uso hospitalario Clorhexidina 4% y Yodopovidona 10% en solución jabonosa, haciendo uso de una metodología dada por la normativa mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 para la DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS GERMICIDAS y validarla mediante el cumplimiento de los parámetros dados por la POLÍTICA 9.4 PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).		
Responsables		
Nombre	Cargo	Firma
Br. William Alexander Ramos Ramírez	Analista	
Br. Carlos Javier Juárez López	Analista	
Autorizado por:		
Lic. Edwin Eliú Alvanez Umaña	Asesor	
Lic. Julio Cesar Henríquez Pérez	Asesor	
PARAMETROS EN ESTUDIO		
Repetibilidad	<p>Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analista: uno - Número mínimo de ensayos: seis - Nivel de fortificación: 75 a 125x10⁸ UFC/mL 	

Reproducibilidad	<p>Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Número de repeticiones: no menos de seis por analista. - Mínimo 2 analistas. - Nivel de fortificación: 75 a 125x10⁸ UFC/mL 	
Recuperación	<p>Recuperación de microorganismos en presencia de producto aplicando neutralización.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Número de repeticiones: al menos 6 porciones de muestra por cada analista. - Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas. - El nivel de fortificación al menos uno y se espera una recuperación entre el 90-110 % log. - La verificación del inóculo puede realizarse durante la ejecución del ensayo por sextuplicado. 	
Sesgo	<p>Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de los resultados (x) del método candidato con un valor de referencia adecuado</p> <ul style="list-style-type: none"> - Número de repeticiones: por lo menos 6 - Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas. - Número de analistas: uno - Nivel de fortificación: 75 a 125x10⁸ UFC/mL 	
Equipos		Materiales
<ul style="list-style-type: none"> - Espectrómetro UV/visible - Agitador vortex - Micropipeta 1000 µL - Cabina de bioseguridad 		<ul style="list-style-type: none"> - Erlenmeyer 250 mL estériles - Beaker 100 mL estéril - Beaker 200 mL estéril - Tubos de ensayo con tapón estériles - Puntas para micropipeta estériles - Placas Petri desechables estériles - Gradilla para tubos de ensayo - Celdas para espectrofotómetro - Frasco descarte - Pipetas volumétricas 9 mL - Probeta 100 mL - Perlas de ebullición - Válvula de 3 vías
Medios de Cultivo		

- Caldo Neutralizante (Dey-Engley)
- Agar Tripticasa Soya
- Caldo Casoy
- Solución Salina 0.9% Estéril
- Agua destilada estéril

PROCEDIMIENTOS

1. Identificación de la muestra

Esta metodología es aplicable a los productos germicidas que etiqueten ser un antiséptico o desinfectante que por lo general deben eliminar el 99.999% de los microorganismos.

Para identificación de las muestras se asignarán únicamente códigos alfanuméricos, nombres genéricos y concentraciones. Se propondrá un formato para etiquetado de muestras en las que la clorhexidina 4% se le atribuirá el código: MC42022 y a la yodopovidona 10% el código: MY102022. (Ver anexo 2)

“Por acuerdos de confidencialidad entre el Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador y el solicitante de análisis, solo se detallará código de muestra y nombre genérico de muestras, sin detallar información adicional.”

2. Preparación de Soluciones

2.1. Preparación de solución salina

- Pesar en balanza analítica 9 g de Cloruro de Sodio.
- Transferir cantidad pesada a un matraz volumétrico de 1000 mL
- Disolver en 500 mL de Agua Purificada, ajustar a un pH de $7,2 \pm 0,2$, agregar agua destilada a volumen y mezclar.
- Dispensar en recipientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min a 15 psi de presión.
- Dejar enfriar y almacenar a una temperatura de 2 a 8 °C.

Alternativa: Si el analista cuenta con solución inyectable de solución salina 0.9% estéril de uso hospitalario también puede hacer uso de esta.

2.2. Preparación de agua estéril

- Medir con ayuda de una probeta 800 mL de agua destilada
- Llevarla a un frasco de 1000 mL y rotularlo debidamente
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos
- Almacenarlo en refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C hasta su posterior uso.

El uso de esta solución será necesario solo si, es requerida una dilución para la preparación de la muestra en evaluación, de lo contrario omitir.

3. Preparación de los Medios de cultivo

3.1. Preparación de caldo neutralizante (Dey Engley)

- Pesar cantidad de medio de cultivo adecuada que desea preparar según indicaciones del fabricante.
- Adicionar gramos pesados de medio en un recipiente adecuado para su preparación.
- Verter volumen total de agua según cantidad que se requiere preparar.
- Nota: realizar lavados con el mismo volumen de agua total para evitar pérdidas del medio.
- Realizar agitación mecánica para facilitar la disolución del medio.
- Medir el valor de pH antes de calentar el medio, en caso de ser necesario ajustar añadiendo cantidad suficiente de NaOH 1 N o HCl 1 N según el rango de pH indicado por el fabricante.
- Realizar calentamiento para facilitar la disolución del medio.
- Tomar una pequeña muestra de medio preparado para posterior lectura de pH
- Llevar medio preparado al autoclave para esterilizar completamente a una temperatura de 120°C por 15 min a 15 psi
- Enfriar luego de esterilizar y tomar el pH de la muestra para ver si cumple con las condiciones del medio.
- Almacenar medio a temperatura de 2 a 8°C para ocupar posteriormente en método de vertido en placa.

3.2. Preparación de agar tripticasa soja (TSA)

- Pesar cantidad de medio de cultivo adecuada que desea preparar según indicaciones del fabricante.
- Adicionar gramos pesados de medio en un recipiente adecuado para su preparación.
- Verter volumen total de agua según cantidad que se requiere preparar.
- Nota: realizar lavados con el mismo volumen de agua total para evitar pérdidas del medio.
- Realizar agitación mecánica para facilitar la disolución del medio.
- Medir el valor de pH antes de calentar el medio, en caso de ser necesario ajustar añadiendo cantidad suficiente de NaOH 1 N o HCl 1 N según el rango de pH indicado por el fabricante.
- Realizar calentamiento para facilitar la disolución del medio.
- Tomar una pequeña muestra de medio preparado para posterior lectura de pH
- Llevar medio preparado al autoclave para esterilizar completamente a una temperatura de 120°C por 15 min a 15 psi
- Enfriar luego de esterilizar y tomar el pH de la muestra para ver si cumple con las condiciones del medio.
- Almacenar medio a temperatura de 2 a 8°C para ocupar posteriormente en método de vertido en placa.

3.3. Preparación de caldo digerido de caseína y soja (Caldo Casoy)

- Pesar cantidad de medio de cultivo adecuada que desea preparar según indicaciones del fabricante.
- Adicionar gramos pesados de medio en un recipiente adecuado para su preparación.
- Verter volumen total de agua según cantidad que se requiere preparar.
- Nota: realizar lavados con el mismo volumen de agua total para evitar pérdidas del medio.
- Realizar agitación mecánica para facilitar la disolución del medio.
- Medir el valor de pH antes de calentar el medio, en caso de ser necesario ajustar añadiendo cantidad suficiente de NaOH 1 N o HCl 1 N según el rango de pH indicado por el fabricante.
- Realizar calentamiento para facilitar la disolución del medio.
- Tomar una pequeña muestra de medio preparado para posterior lectura de pH
- Llevar medio preparado al autoclave para esterilizar completamente a una temperatura de 120°C por 15 min a 15 psi
- Enfriar luego de esterilizar y tomar el pH de la muestra para ver si cumple con las condiciones del medio.
- Almacenar medio a temperatura de 2 a 8°C para ocupar posteriormente en método de vertido en placa.

4. Identificación de los microorganismos de referencia

Los microorganismos requeridos para la validación están dados por la normativa mexicana para comprobar la eficacia antimicrobiana de los germicidas.

- ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**
- ***Escherichia coli* ATCC 11229**

5. Preparación y acondicionamiento de las cepas ATCC

Realizar una serie de procedimientos para llevar a cabo la correcta reanimación de las cepas de referencia.

5.1. Reanimación de cepas de referencia.

- Dejar que la bolsa del pellet sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abrir la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad del pellet.
- Retirar la porción de la etiqueta, rasgar y colocar a la placa de cultivo principal o al registro de Control de Calidad. No desarmar el dispositivo durante la hidratación.

- Sobre el borde de la mesa de trabajo, agrietar la ampolla en la parte superior del pellet (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- Mantener de forma vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- Apretar la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- De inmediato, saturar el hisopo abundantemente con el material hidratado y transferir al medio con agar correspondiente
- Inocular la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- Descartar el pellet de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- De inmediato, incubar la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.

5.2. Conservación de los microorganismos de prueba

- Tomar crecimiento microbiano de la placa inoculada con la unidad del pellet con un hisopo completamente estéril.
- Estriar en tres placas de agar TSA e incubar 24h a una temperatura de 30 a 35 °C
- Adicionar 5 mL de caldo CASOY a cada una de las placas incubadas con ayuda de una micropipeta P1000
- Adicionar perlas de ebullición para facilitar el arrastre de microorganismos a un beaker de 100 mL completamente estéril que contendrá la suspensión madre de microorganismos.
- Tomar de la suspensión madre 850 μ L y agregar 150 μ L de glicerina para crear un medio crioprotector.
- Rotular cada uno de los crioviales con el número de ATCC que lo identifica y agitar para homogeneizar la suspensión.
- Depositar en un rack y almacenar en el ultracongelador a una temperatura de -40 a -80°C.

PROCEDIMIENTO DE VALIDACION DE EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA

6. Preparación de la suspensión madre y estandarización de los microorganismos

- Tomar del ultracongelador los microorganismos de prueba que se van a utilizar.
- Ambientar crioviales que contienen las cepas ATCC hasta descongelar completamente.
- Tomar con un hisopo estéril suspensión de microorganismos y estriar completamente en una placa con agar TSA e incubar 24h a una temperatura de 30 a 35 °C.
- Tomar crecimiento microbiano de la placa y estriar otras 3 placas con agar TSA, incubar a una temperatura de 30 a 35°C por 24 h.
- Adicionar 5 mL de caldo CASOY a cada una de las placas incubadas con ayuda de una micropipeta P1000.

- Adicionar perlas de ebullición para facilitar el arrastre de microorganismos.
- Transferir a un beaker de 100 mL completamente estéril la suspensión de microorganismos.
- Transferir 1000 μ L de suspensión de microorganismos a un tubo con caldo CASOY que contenga 9.0 mL.
- Ajustar %transmitancia de suspensión madre a una longitud de onda de 580 nm hasta llegar a una lectura entre 3% de transmitancia.
- Determinar en la suspensión el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / mL) y precisar el por ciento de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125 X 10⁸ UFC/mL.

7. Determinación de la cuenta viable (CV) de los microorganismos

- Efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una entre 25 y 250 UFC.
- Transferir 1 mL de la suspensión de microorganismos de prueba estandarizada a un Erlenmeyer que contenga 99 mL de solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril (dilución 1:100 o 10⁻²)
- Hacer tres diluciones 1:100 adicionales de manera secuencial (10⁻⁴, 10⁻⁶, y 10⁻⁸) y luego hacer una dilución 1:10 para llegar a la dilución 10⁻⁹
- Colocar en cajas de petri estériles 1 mL de cada dilución por duplicado.
- Agregar a cada placa un volumen de 20 mL aproximadamente de agar TSA.
- Homogeneizar y dejar solidificar, invertir las cajas de petri e incubar durante 48 h a una temperatura entre 30 a 35°C.
- Realizar conteo de UFC luego del debido tiempo de incubación con ayuda del cuenta colonias.

8. Dilución de muestra a 1:10 de clorhexidina 4% y Yodopovidona 10%

- Medir exactamente 10 mL de muestra con una probeta de 20mL estéril, transferir a un matraz de 250 mL con tapón de rosca estériles.
- Medir con una probeta 90 mL de agua destilada estéril y transferir al matraz con la muestra para obtener una dilución 1:10.
- Agitar hasta homogeneizar completamente la muestra con el cuidado de no formar demasiada espuma.
- Extraer 1 mL de muestra del matraz y depositarlo en un descarte *
- Repetir el procedimiento para completar 6 matraces con muestra diluida.

*El objetivo de extraer 1 mL es para obtener una dilución 1:100 al diluir 1 mL del inóculo de la suspensión de microorganismo.

REPETIBILIDAD

Para la realización y cumplimiento del parámetro se seguirán las especificaciones dadas para este.

- Sera realizado por un analista.
- Debe realizar la cantidad de 6 ensayos con cada una de las muestras y los microorganismos en el orden que se presenta a continuación:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Documentar los resultados de cada una de las determinaciones del porcentaje de reducción con cada una de las muestras en presencia de cada microorganismo por separado en los tiempos de 5s, 15s y 30s, siguiendo cada uno de los procedimientos siguientes:

Clorhexidina 4%

Efectividad antimicrobiana:

- Tomar un matraz con la muestra diluida como se muestra en el procedimiento N° 8.
- Inocular un matraz con 1 mL de suspensión de microorganismos previamente estandarizado en el procedimiento N°6 en el centro de la superficie de la muestra, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.
- Agitar el matraz fuertemente con la muestra inoculada y exactamente en los tiempos de: 5, 15 y 30 segundos tomar un 1.0 mL
- Transferir la cantidad tomada a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de caldo neutralizante y mezclar, esta es la primera dilución 10^{-1} .
- Continuar haciendo las diluciones siguientes en tubos con neutralizante: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}
- Transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles de cada una de las diluciones.
- Agregar a cada placa de 20 mL del medio agar TSA, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 24h a 35°C.
- Repetir el procedimiento hasta completar 6 ensayos realizados.

Yodopovidona 10%

Efectividad antimicrobiana:

- Tomar un matraz con la muestra diluida como se muestra en el procedimiento N° 8.
- Inocular un matraz con 1 mL de suspensión de microorganismos previamente estandarizado en el procedimiento N°6 en el centro de la superficie de la muestra, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.

- Agitar el matraz fuertemente con la muestra inoculada y exactamente en los tiempos de: 5, 15 y 30 segundos tomar un 1.0 mL
- Transferir la cantidad tomada a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de caldo neutralizante y mezclar, esta es la primera dilución 10^{-1} .
- Continuar haciendo las diluciones siguientes en tubos con neutralizante: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}
- Transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles de cada una de las diluciones.
- Agregar a cada placa de 20 mL del medio agar TSA, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 24h a 35°C.
- Repetir el procedimiento hasta completar 6 ensayos realizados

REPRODUCIBILIDAD

Para la realización y cumplimiento del parámetro se seguirán las especificaciones dadas para este.

- Será realizado por dos analistas.
- Deben realizar la cantidad de 6 ensayos con cada una de las muestras y los microorganismos en el siguiente orden:

Analista 1:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Analista 2:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Documentar los resultados de cada una de las determinaciones del porcentaje de reducción con cada una de las muestras en presencia de cada microorganismo en los tiempos de 5s, 15s y 30s, siguiendo cada uno de los procedimientos siguientes:

Clorhexidina 4%

- Tomar un matraz con la muestra diluida como se muestra en el procedimiento N° 8.
- Inocular un matraz con 1 mL de suspensión de microorganismos previamente estandarizado en el procedimiento N°6 en el centro de la superficie de la muestra, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.
- Agitar el matraz fuertemente con la muestra inoculada y exactamente en los tiempos de: 5, 15 y 30 segundos tomar un 1.0 mL
- Transferir la cantidad tomada a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de caldo neutralizante y mezclar, esta es la primera dilución 10^{-1} .

- Continuar haciendo las diluciones siguientes en tubos con neutralizante: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}
- Transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles de cada una de las diluciones.
- Agregar a cada placa de 20 mL del medio agar TSA, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 24h a 35°C.
- Repetir el procedimiento hasta completar 6 ensayos realizados

Yodopovidona 10%

- Tomar un matraz con la muestra diluida como se muestra en el procedimiento N° 8.
- Inocular un matraz con 1 mL de suspensión de microorganismos previamente estandarizado en el procedimiento N°6 en el centro de la superficie de la muestra, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.
- Agitar el matraz fuertemente con la muestra inoculada y exactamente en los tiempos de: 5, 15 y 30 segundos tomar un 1.0 mL
- Transferir la cantidad tomada a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de caldo neutralizante y mezclar, esta es la primera dilución 10^{-1} .
- Continuar haciendo las diluciones siguientes en tubos con neutralizante: 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6}
- Transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles de cada una de las diluciones.
- Agregar a cada placa de 20 mL del medio agar TSA, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 24h a 35°C.
- Repetir el procedimiento hasta completar 6 ensayos realizados

RECUPERACION

Para la realización y cumplimiento del parámetro se seguirán las especificaciones dadas para este.

- Se realizará tomando al menos 6 porciones de muestra por cada analista.
- Cada microorganismo se debe de poner en contacto en presencia de cada una de las porciones de muestras por separado.

Procedimiento

Determinación de la recuperación de microorganismos

- Tomar 6 tubos conteniendo 9 mL de caldo neutralizante
- Tomar las 6 porciones de muestra en cantidades de 1 mL y depositarlas en cada uno de los tubos con neutralizante.
- Agitar con vortex cada uno de los tubos hasta su completa homogeneización.
- Inocular cada uno de los tubos con 0.1 mL de la dilución de microorganismos con la CV del procedimiento N°7.
- Agitar en vortex cada uno de los tubos con las porciones de muestras.
- Colocar en placas estériles 1 ml de cada uno de los tubos por duplicado.

- Agregar por vertido aproximadamente 20 mL de agar TSA, homogeneizar y dejar solidificar e incubar a una temperatura de 35°C por 48 h.
- Realizar el conteo de las colonias recuperadas con ayuda de cuenta colonias.
- Reportar los resultados de los recuentos.

SESGO

Para la realización y cumplimiento del parámetro se seguirán las especificaciones dadas para este.

- Se debe realizara por la cantidad de un analista.
- Debe realizar la cantidad de 6 ensayos de recuperación con cada una de las muestras y su neutralizante con los microorganismos como se presenta a continuación:

Clorhexidina 4%		Yodopovidona 10%	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229

Procedimiento:

- Tomar 1 tubos conteniendo 9 mL de caldo neutralizante
- Tomar 1 mL de muestra y depositarla en el tubo con neutralizante.
- Agitar con vortex cada uno de los tubos hasta su completa homogeneización.
- Inocular cada uno de los tubos con 0.1 mL de la dilución de microorganismos con la CV del procedimiento N°7
- Agitar en vortex.
- Colocar en placas estériles 1 ml de cada una de los tubos por duplicado.
- Agregar por vertido aproximadamente 20 mL de agar TSA, homogeneizar y dejar solidificar e incubar a una temperatura de 35°C por 48 h.
- Realizar el conteo de las colonias recuperadas con ayuda de cuenta colonias.
- Repetir el procedimiento por sextuplicado.
- Reportar los resultados

FORMULAS PARA DETERMINACIÓN DE PARAMETROS

Las siguientes fórmulas serán las utilizadas para poder realizar los respectivos cálculos en la determinación de cada parámetro de validación:

– REPETIBILIDAD

Fórmulas:

Fórmula para calcular la repetibilidad

$$r_{\cdot} = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR^2}{n}}$$

Desviación estándar relativa

$$DSR = \frac{S}{\bar{X}}$$

Porcentaje de repetibilidad

$$\%r_{\cdot} = \frac{S}{\bar{X}}$$

Donde:

r: Repetibilidad

DSR: Desviación Estándar Relativa

S: Desviación estándar

X̄: Promedio

Criterio de aceptación.

Límite de repetibilidad $r < 3 \%$

– **REPRODUCIBILIDAD**

Formulas:

Reproducibilidad

$$R = 2.8 * \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{n}}$$

Porcentaje de reproducibilidad

$$\%R = R * 100$$

Donde:

R: Reproducibilidad

DSR: Desviación Estándar Relativa

S: Desviación estándar

X̄: Promedio

Criterio de aceptación.

$$R < 3 \%$$

– **RECUPERACION**

Fórmula:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Media del logaritmo del recuento} * 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}}$$

Criterio de aceptación:

Recuperación entre el 90-110 % log.

– **SESGO**

Fórmula:

$$Sesgo = X_{recuperado} - X_{inoculado}$$

Criterio de aceptación.

La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es $< 0.3 \log$	
Revisado por: _____	Firma: _____
Revisado por: _____	Firma: _____
Aprobación de Protocolo de Validación	
Nombre: _____	Firma: _____
Nombre: _____	Firma: _____

El protocolo de validación para comprobar efectividad antimicrobiana en clorhexidina 4% y yodopovidona 10% es un documento que indica cómo realizar la validación del método, donde se encuentran objetivos, alcance, procedimientos, parámetros de desempeño, criterios de aceptación, cálculos estadísticos, formatos para la recopilación de datos, etc. A partir de los lineamientos indicados en el protocolo de validación se obtendrán resultados que evidencian si el método es óptimo para su fin previsto. Los numerales 5.2 al 5.7 corresponden a la validación del método dando seguimiento al protocolo de validación descrito en el punto 5.1, se analizan los resultados obtenidos, recopilando la información necesaria para elaborar el informe de validación.

5.2 Estandarización y determinación de cuenta viable inicial de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229

Para determinar la efectividad antimicrobiana de los antisépticos de estudio se definió la concentración viable inicial de cada uno de los microorganismos de prueba estandarizado con un espectrofotómetro UV-VIS a un porcentaje de transmitancia de 3%. Ver tabla N°7 y tabla N°8.

Tabla N°7. Determinación de cuenta viable inicial de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Estandarización de Cepas de Referencia.					
Datos					
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538					
Ensayo: Calculo de cuenta viable inicial					
Analistas Responsables: Carlos Javier Juárez López William Alexander Ramos Ramírez					
Analista	% de Transmitancia	Dilución	UFC	\bar{X}_{UF} C	\bar{X} CV (UFC/mL)
Carlos	3%	10 ⁻⁶	21	22.5	2.0x10 ⁷
			24		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	23	21	
			19		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	20	21	
			22		
William	3%	10 ⁻⁶	15	16	
			17		
William	3%	10 ⁻⁶	22	20	
			18		
William	3%	10 ⁻⁶	21	19.5	
			18		
Observaciones:			Suma	120	
			Promedio	20	

La suspensión madre del microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se estandarizó a un 3% de Transmitancia seguido de una serie de diluciones seriadas hasta llegar a la dilución que permitió obtener recuento microbiano. Este ensayo se realizó un total de 6 veces (tres ensayos por analista) ⁽¹⁵⁾ obteniendo recuento microbiano en la dilución 10⁻⁶, se promediaron las unidades formadoras

de colonia obtenidas (UFC) y se multiplican por el recíproco del factor de dilución que para tal caso es de 10^6 , obteniendo una concentración viable inicial de 2.0×10^7 UFC/ml ⁽¹⁰⁾ necesario para calcular el porcentaje de reducción al ser relacionada con la concentración obtenida del microorganismo bajo condiciones de prueba en presencia del antiséptico.

Tabla N°8. Determinación de cuenta viable inicial de *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Estandarización de Cepas de Referencia.					
Datos					
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229					
Ensayo: Calculo de cuenta viable inicial					
Analistas Responsables: Carlos Javier Juárez López William Alexander Ramos Ramírez					
Analista	% de Transmitancia	Dilución	UFC	\bar{X}_{UF} C	\bar{X} CV (UFC/mL)
Carlos	3%	10^{-6}	50	49.5	5.0x10 ⁷
			49		
Carlos	3%	10^{-6}	39	40.5	
			42		
Carlos	3%	10^{-6}	57	57	
			57		
William	3%	10^{-6}	48	46.5	
			45		
William	3%	10^{-6}	52	54.5	
			57		
William	3%	10^{-6}	52	53.5	
			55		
Observaciones:			Suma	301. 5	
			Promedio	50	

La suspensión madre del microorganismo *Escherichia coli* ATCC 11229 se estandarizó a un 3% de Transmitancia seguido de una serie de diluciones seriadas hasta llegar a la dilución que permitió obtener recuento microbiano. Se realizaron un total de 6 veces (tres ensayos por analista) ⁽¹⁵⁾ obteniendo recuento microbiano en la dilución 10^{-6} , se promediaron las unidades formadoras de colonia obtenidas (UFC) y se multiplican por el factor de dilución, obteniendo una

concentración viable inicial de 5.0×10^7 UFC/ml ⁽¹⁰⁾ necesario para calcular el porcentaje de reducción al ser relacionada con la concentración obtenida del microorganismo bajo condiciones de prueba en presencia del antiséptico.

5.3 Determinación de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 en diferentes tiempos de acción.

La determinación de efectividad antimicrobiana del antiséptico debe ser realizada individualmente con cada uno de los microorganismos de prueba, es decir, que la clorhexidina 4% debe comprobar su efectividad antimicrobiana en presencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. Se realizaron 6 ensayos por analista de comprobación de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% ⁽¹⁵⁾ Ver tabla N°9

Tabla N°9. Resumen de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Efectividad Antimicrobiana									
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%									
Nombre genérico de muestra: Clorhexidina 4%									
Código de muestra: MCL42022									
Porcentaje de transmitancia: 3%									
Criterio: $\geq 99.999\%$ en 30s de contacto.									
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538									
N° ensayos	Dilución	Analista 1	% Reducción			Analista 2	% Reducción		
			5s	15s	30s		5s	15s	30s
1	10 ⁻⁶	Carlos Juárez	-7	45	100	William Ramos	15	45	100
2			-5	50	100		15	50	98
3			-15	48	100		8	35	98
4			0	38	100		3	55	100
5			3	50	95		-17	50	98
6			18	63	100		3	58	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129									
N° ensayos	Dilución	Analista 1	% Reducción			Analista 2	% Reducción		

			5s	15s	30s		5s	15s	30s
1	10 ⁻¹	Carlos Juárez	100	100	100	William Ramos	29	100	99
2			100	100	100		83	99	100
3			100	100	100		99	100	99
4			100	100	100		97	100	100
5			100	100	100		68	100	100
6			100	100	100		67	100	100

La eficacia antimicrobiana del método se determinó a través del porcentaje de reducción, es decir la capacidad que tiene el antiséptico de eliminar microorganismos. Para que un antiséptico se considere un germicida eficiente debe ser capaz de eliminar el 99.999% de microorganismos o mayor en tiempo de 30 segundos de contacto ⁽¹⁰⁾.

5.3.1 Efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por analista.

La suspensión estandarizada de *Staphylococcus aureus* en presencia de clorhexidina permite obtener recuento microbiano en la dilución 10⁻⁶, la relación entre las células sobrevivientes y la concentración viable inicial de los microorganismos permitió obtener el porcentaje de reducción en diferentes tiempos de acción. Los resultados del analista 1 y 2 en los tiempos de contacto 5 y 15 segundos del microorganismo en presencia de la muestra indican ineficacia del producto germicida, Sin embargo, en el caso de ambos analistas lo resultados demuestran que en un tiempo de contacto de 30 segundos el producto es eficiente frente a la *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

5.3.2 Efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% frente a *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista.

Los cálculos del analista 1 demuestran en sus resultados que el producto cumple con la actividad germicida en los 3 tiempos de acción. El analista 2 demuestra que para un tiempo de 5 segundos de acción no es suficiente para ejercer la

actividad germicida, pero para los tiempos de 15 y 30 segundos muestra ser eficiente. La clorhexidina 4% demuestra mayor actividad antimicrobiana frente a la *Escherichia coli* permitiendo obtener recuento microbiano en la primera dilución (10^{-1}) y demostrando ser más eficaz en menor tiempo de acción que frente a *Staphylococcus aureus*.

Para que el método pueda ser validado se debe demostrar el cumplimiento de los parámetros de validación, por este motivo los resultados obtenidos serán tomados en cuenta en su totalidad para determinar repetibilidad y reproducibilidad del método, aunque esté fuera del porcentaje de reducción que la norma indica.

5.4 Cálculos de parámetros de estudio para clorhexidina 4%

5.4.1 Parámetro de repetibilidad para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

Los resultados obtenidos del % de reducción en la tabla N°9 permitieron conocer si el método cumple condiciones de repetibilidad entre los ensayos que fueron realizados, se tomaron los resultados obtenidos del analista 1 para la evaluación de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* y los resultados del analista 2 frente *Escherichia coli*. Ver tabla N°10.

Tabla N°10 Parámetro de repetibilidad de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.
(Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos					
Datos					
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%					
Parámetro de estudio: Repetibilidad					
Nombre genérico de muestra: Clorhexidina 4%					
Código de muestra: MCL42022					
Criterio de aceptación: $r < 3\%$					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538					
Analista 1	Tiempo	S1	DSR 1 ²	% Repetibilidad	Cumple/ No cumple
Carlos	5s	11.1893	125.2000	1279.0413	No cumple
	15s	8.1976	0.0280	19.1236	No cumple
	30s	2.5820	0.0007	2.3529	Cumple
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129					
Analista 2	Tiempo	S2	DSR2 ²	% Repetibilidad	Cumple/ No cumple
William	5s	25.8644	0.1227	40.0435	No cumple
	15s	0.4082	1.6722E-05	0.4674	Cumple
	30s	0.5164	2.6845E-05	0.5923	Cumple

En la Tabla N°10 se encuentran detallados los cálculos de “S” y “DSR” de cada analista, S1 y DSR1 corresponde al analista 1, S2 y DSR2 corresponden al analista 2, esta serie de datos fueron utilizados en la determinación de los porcentajes de repetibilidad en los diferentes tiempos de acción para cada bacteria.

Los ensayos realizados por el analista 1 de clorhexidina 4% frente a *Staphylococcus aureus* en el tiempo de 5 y 15 segundos no cumple con el criterio de repetibilidad y para el tiempo de 30 segundos se muestra una repetibilidad de 2.12% cumpliendo con el criterio de aceptación donde el límite de repetibilidad debe ser menor al 3% que establece el parámetro. Los ensayos realizados por el analista 2 de clorhexidina 4% frente a *Escherichia coli* para el tiempo de 5 segundos no cumplen con el criterio de aceptación en los resultados debido a

que es mayor al 3%, para los tiempos de 15 y 30 segundos los resultados cumplen con el criterio de aceptación el cual el límite debe ser menor al 3% para el parámetro de repetibilidad ⁽¹⁵⁾.

Para el cumplimiento de este parámetro se debe demostrar repetibilidad de los ensayos realizados en ambos microorganismos de prueba. Los resultados obtenidos demuestran que únicamente a los 30 segundos se da cumplimiento a este parámetro con una repetibilidad menor al 3% ⁽¹⁵⁾.

5.4.2 Parámetro de reproducibilidad para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

La reproducibilidad del método se demostró a través de la comparación de resultados entre al menos 2 analistas, se analizan los datos obtenidos en la tabla N°9 para ver si existe reproducibilidad del método en la evaluación de efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% frente a los microorganismos de prueba en los tiempos de 5, 15 y 30 segundos. En la Tabla N°11 se encuentran detallados los cálculos de "S" y DSR" de cada analista, S1 y DSR1 corresponde al analista 1, S2 y DSR2 corresponden al analista 2, esta serie de datos fueron utilizados en la determinación de los porcentajes de reproducibilidad en los diferentes tiempos de acción para cada bacteria.

Tabla N°11. Resumen de cálculo del parámetro de reproducibilidad de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos						
DATOS						
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%						
Parámetro de estudio: Reproducibilidad						
Nombre genérico de muestra: Clorhexidina 4%						
Código de muestra: MCL42022						
Criterio de aceptación: $R < 3\%$						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538						
Tiempo s	S1	S2	DSR 1 ²	DSR 2 ²	% Reproducibilidad	Cumple
5s	11.1893	11.8279	125.2	6.9086	929.0370	No cumple
15s	8.1976	8.1343	0.0280	0.02775	19.0823	No cumple
30s	2.0412	1.0954	0.0004	0.0001	1.8889	Cumple
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129						
Tiempo s	S1	S2	DSR 1 ²	DSR 2 ²	% Reproducibilidad	Cumple
5s	6.9402	25.8644	0.0051	0.1227	28.8976	No cumple
15s	0	0.4082	0.0000	1.6722E-05	0.3305	Cumple
30s	0	0.5164	0	2.6845E-05	0.4188	Cumple

Para clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se puede evidenciar reproducibilidad en el tiempo de 30 segundos con un porcentaje del 1.8889% cumpliendo con el criterio de aceptación, los ensayos realizados en los tiempos de 5 y 15 segundos no evidencian reproducibilidad debido a que se encuentran por fuera del criterio de aceptación.

Para clorhexidina 4% en presencia de *Escherichia coli* ATCC 11229 se pudo evidenciar una buena reproducibilidad en los tiempos de 15 y 30 segundos con un porcentaje de reproducibilidad de 0.3305% y 0.4188% respectivamente, cumpliendo con el criterio de aceptación ⁽¹⁵⁾. Los ensayos que corresponden al

tiempo de 5 segundos no demuestran reproducibilidad debido a que se encuentran por fuera del criterio de aceptación.

Para términos de validación del método de efectividad antimicrobiana los parámetros deben dar cumplimiento en su totalidad para ambos microorganismos de prueba por lo tanto para la muestra de clorhexidina 4% se demostró que los resultados son reproducibles al cabo de 30 segundos de contacto en presencia de los microorganismos de prueba.

5.4.3 Parámetro de recuperación para ensayo de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

El procedimiento para el ensayo de recuperación siguió el mismo procedimiento de comprobación de efectividad antimicrobiana con la diferencia que la muestra fue inactivada en un tiempo cero es decir que el antiséptico no generó su mecanismo de acción frente al microorganismo de prueba ya que, lo que se busca es evaluar la recuperación del microorganismo bajo las mismas condiciones de ensayo. Los resultados demostraron el % de recuperación de cada microorganismo tomando como referencia la concentración viable inicial (CV) obtenida. La prueba exige demostrar la recuperación de cada microorganismo en presencia de clorhexidina 4% por analista. Ver tabla N°12 y N°13.

Tabla N°12. Resultados del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos				
DATOS				
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%				
Parámetro de estudio: Recuperación				
Código de muestra: MCL42022				
Analista 1: Carlos Javier Juárez López				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
UFC/mL CV	Log de CV	Media del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
20000000	7.3010	7.3994	101.3475	Cumple
Criterio de aceptación		90-110%		
<i>Escherichia coli</i> ATCC11229				
UFC/mL CV	Log de CV	Media del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
50000000	7.6990	7.5379	97.9085	Cumple
Criterio de aceptación		90-110%		

Tabla N°13. Resultados del porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC11229 por analista 2.
(Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos				
DATOS				
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%				
Parámetro de estudio: Recuperación				
Código de muestra: MCL42022				
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
UFC/mL CV	Log de CV	Media del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2000000 0	7.3010	7.2367	99.1190	Cumple
Criterio de aceptación		90-110%		
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129				
UFC/mL CV	Log de CV	Media del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5000000 0	7.6990	7.6348	99.1668	Cumple
Criterio de aceptación		90-110%		

La Tabla N°12 y Tabla N°13 muestran datos necesarios para calcular el porcentaje de recuperación, se muestra la concentración viable determinada para cada microorganismo de prueba y sus valores calculados en logaritmo, también se muestra la media del log del recuento, el cual son los valores de la media de los recuentos de recuperación en logaritmo. Los resultados del analista 1 en la tabla N°8 muestran los porcentajes de recuperación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* es de 101.35% y 97.91% respectivamente. La Tabla N°13 detalla los resultados del analista 2 con respecto a los dos microorganismos: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* donde el porcentaje de recuperación fue del 99.12% y 99.17% respectivamente.

El criterio de aceptación para este parámetro establece que el porcentaje de recuperación obtenido debe estar entre el 90-110% ⁽¹⁵⁾, por lo tanto, los resultados obtenidos del analista 1 como del analista 2 cumplen con el criterio de aceptación. El cumplimiento de este parámetro demuestra que la realización del método bajo las condiciones específicas de pruebas no es impedimento para la recuperación del microorganismo ya que el único factor que debe afectar el crecimiento microbiano es el mecanismo de acción del antiséptico.

5.4.4 Sesgo del ensayo de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

El sesgo se calcula a partir de la diferencia absoluta entre los valores obtenidos (microorganismos recuperados del ensayo) y el valor de referencia (concentración viable inicial), para este parámetro se necesitó la realización 6 ensayos por un analista bajo las condiciones descritas en el parámetro de recuperación ⁽¹⁵⁾. Ver tabla N°14 y tabla N°15.

Tabla N°14. Resultados de los ensayos para la determinación del parámetro de sesgo con muestra de clorhexidina 4% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos						
Datos						
Parámetro de estudio: Sesgo						
Código de muestra: MCL42022						
Microorganismo de prueba: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	Log/R- I/	Cumple/ No cumple
1	23	21.5	2.2E+0 7	7.3324	0.03	Cumple
	20					
2	19	21.5	2.2E+0 7	7.3324	0.03	Cumple
	24					
3	26	27.5	2.8E+0 7	7.4393	0.14	Cumple
	29					

4	19	18	1.8E+07	7.2553	0.05	Cumple
	17					
5	23	29	2.9E+07	7.4624	0.16	Cumple
	35					
6	22	22	2.2E+07	7.3424	0.04	Cumple
	22					
Criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	2.0E+07 UFC/mL			7.3010		

Tabla N°15. Resultados de los ensayos para la determinación del parámetro de sesgo con muestra de clorhexidina 4% en presencia de *Escherichia coli* ATCC 11229 analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico						
Datos						
Parámetro de estudio: Sesgo						
Código de muestra: MCL42022						
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229						
Analista 2: William Alexander Ramos Ramirez						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-I/	Cumple/ No cumple
1	44	45	4.5E+07	7.6532	0.05	Cumple
	46					
2	48	46	4.6E+07	7.6627	0.04	Cumple
	44					
3	46	40.5	4.1E+07	7.6074	0.09	Cumple
	35					
4	41	39.5	4.0E+07	7.5965	0.10	Cumple
	38					
5	36	38	3.8E+07	7.5797	0.12	Cumple
	40					
6	48	42.5	4.3E+07	7.6283	0.07	Cumple
	37					
criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	5.0E+07			7.7011		

Las tablas N°14 y tabla N°15 muestran una serie de datos que son necesarios para determinar el parámetro, se visualizan la sección de N° de porciones usadas, Recuento de lo recuperado (R) son los recuentos obtenidos por duplicado, promedio de los recuentos obtenidos, [R] muestra la concentración recuperada, log [R] es el valor de la concentración de microorganismos en

términos de logaritmo, (I) concentración inoculada la cual es la misma concentración CV, Log de I es el valor de la concentración inoculada en términos de logaritmo, /R-I/ se muestra la diferencia absoluta entre lo inoculado y lo recuperado en términos de logaritmo y Criterio: muestra el valor de referencia con el cual deben cumplir los resultados obtenidos.

Los ensayos que se muestran en la tabla N°14 y N°15 fueron realizados por el analista 1 y 2 respectivamente. Se calculó la diferencia absoluta entre el microorganismo recuperado en cada uno de los ensayos y la concentración inicial inoculada de *Staphylococcus aureus* (2.0E+07 UFC/mL) y *Escherichia coli* (5.0E+07). Los resultados obtenidos de cada una de las porciones muestran un sesgo menor al 0.3 para cada uno de los microorganismos, por lo tanto, se cumple con el criterio de aceptación como indica el parámetro de sesgo para la muestra de clorhexidina 4%.

5.5 Determinación de efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 en diferentes tiempos de acción.

La determinación de efectividad antimicrobiana del antiséptico debe ser realizada individualmente con cada uno de los microorganismos de prueba, es decir, que la yodopovidona 10% debe comprobar su efectividad antimicrobiana en presencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. Se realizaron 6 ensayos por analista de comprobación de efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10%. Ver tabla N°16

Tabla N°16 Resumen efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Efectividad Antimicrobiana									
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10%									
Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%									
Código de muestra: MY102022									
Porcentaje de transmitancia: 3%									
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538									
N° ensayos	Dilución	Analista 1	% Reducción			Analista 2	% Reducción		
			5s	15s	30s		5s	15s	30s
1	10 ⁻²	Carlos Juárez	-	100	100	William Ramos	-	100	100
2			-	100	100		-	100	100
3			-	100	100		-	100	100
4			-	100	100		-	100	100
5			-	100	100		-	100	100
6			-	100	100		-	100	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129									
N° ensayos	Dilución	Analista 1	% Reducción			Analista 2	% Reducción		
			5s	15s	30s		5s	15s	30s
1	10 ⁻⁶	Carlos Juárez	-1	33	99	William Ramos	-22	60	99
2			40	72	99		59	68	97
3			73	92	99		63	79	98
4			21	73	100		25	100	100
5			34	82	100		68	100	100
6			68	100	100		67	100	100

La eficacia antimicrobiana del método se determinó a través del porcentaje de reducción, el cual se define como la capacidad del antiséptico para eliminar microorganismos ⁽¹⁰⁾. Para que un antiséptico se considere un germicida eficiente debe eliminar el 99.999% de microorganismos ⁽¹⁰⁾.

5.5.1 Efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por analista.

La suspensión estandarizada de *Staphylococcus aureus* en presencia de yodopovidona 10% permite obtener recuento microbiano hasta la dilución 10^{-2} , la relación entre las células sobrevivientes y la concentración viable inicial de los microorganismos permitió obtener el porcentaje de reducción en diferentes tiempos de acción. La dilución seleccionada por los analistas 1 y 2 reflejan una alta efectividad antimicrobiana de yodopovidona en el tiempo de 15 y 30 segundos ya que en la totalidad de los ensayos el porcentaje de reducción es el 100% sin embargo a los 5 segundos no es posible realizar un cálculo ya que las colonias son demasiado numerosas para contar.

5.5.2 Efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% frente a *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista.

Escherichia coli fue puesta a prueba frente a yodopovidona 10% y se determinó que en los tiempos de 5 y 15 segundos muestran porcentajes de reducción por debajo del 99.999% en la mayoría de sus resultados a excepción de los 30 segundos que se muestra una mayor efectividad antimicrobiana en ambos analistas. La yodopovidona 10% es más efectiva frente *Staphylococcus aureus* ya que no existe variación entre los resultados con un porcentaje de reducción del 100%.

Para que el método pueda ser validado se debe demostrar el cumplimiento de los parámetros de validación, es por eso que los resultados obtenidos fueron tomados en cuenta en su totalidad para determinar repetibilidad y reproducibilidad del método, aunque esté fuera del porcentaje de reducción que la norma indica ⁽¹⁰⁾.

5.6 Cálculos de parámetros de estudio para yodopovidona 10%.

5.6.1 Parámetro de repetibilidad para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

Los resultados obtenidos del porcentaje de reducción en la tabla N°16 nos permitió conocer el cumplimiento en condiciones de repetibilidad entre los ensayos realizados, se tomarán los resultados obtenidos del analista 2 para la evaluación de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* y los resultados del analista 1 frente *Escherichia coli*. Ver tabla N°17

Tabla N°17. Resultados del parámetro de repetibilidad de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos					
Datos					
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Yodopovidona 10%					
Parámetro de estudio: Repetibilidad					
Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%					
Código de muestra: MY102022					
Criterio de aceptación: $r < 3\%$					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538					
Analista 2	Tiempos	S2	DSR 2 ²	% Repetibilidad	Cumple/ No cumple
William	5s	-	-	-	-
	15s	0	0	0	Cumple
	30s	0	0	0	Cumple
<i>Escherichia coli</i> ATCC1129					
Analista 1	Tiempos	S1	DSR 1 ²	% Repetibilidad	Cumple
Carlos	5s	28.0957	0.5146	81.9983	No cumple
	15s	23.4065	0.0965	35.5167	No cumple
	30s	0.5477	3.0302E-05	0.6292	Cumple

En la Tabla N°17 se encuentran detallados los cálculos de S y DSR de cada analista, S1 y DSR1 corresponde al analista 1, S2 y DSR2 corresponden al analista 2, esta serie de datos fueron utilizados en la determinación de los

porcentajes de repetibilidad en los diferentes tiempos de acción para cada bacteria.

Los ensayos realizados de efectividad antimicrobiana por el analista 2 con la muestra de yodopovidona 10% frente a *Staphylococcus aureus* en la dilución muestran condiciones de repetibilidad en los tiempos de 15 y 30 segundos ya que el porcentaje de repetibilidad es de 0%, esto indica que la desviación entre los resultados de los ensayos realizados es cero ya que los datos en su totalidad indican un 100% del porcentaje de reducción, el tiempo de 5 segundos no es tomado en cuenta debido a que no es posible calcular el porcentaje de reducción porque el número de colonias era demasiado alto para hacer un recuento microbiano y realizar un cálculo correcto.

Para el análisis 1, los resultados obtenidos de yodopovidona 10% frente a *Escherichia coli* muestran que los tiempos de 5 y 15 segundos no generan condiciones de repetibilidad entre los 6 ensayos realizados ya que los resultados son 81.9983% y 36.5167% respectivamente. Para el tiempo de 30 segundos del antiséptico frente a *Escherichia coli* muestra las condiciones aceptables de repetibilidad del 0.6292%, cumpliendo con el criterio de aceptación del parámetro.

Para que el parámetro de repetibilidad en el análisis de efectividad antimicrobiana sea tomado en cuenta debe cumplir con ambos microorganismos de prueba, es por ello que el cumplimiento de este parámetro para esta metodología se da en un tiempo de 30 segundos.

5.6.2 Resultados de reproducibilidad para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

La reproducibilidad del método se demuestra a través de la comparación de resultados entre al menos 2 analistas, se analizaron los datos obtenidos en la tabla N°16 para poder comprobar reproducibilidad del método en la evaluación de efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% frente a los microorganismos de prueba en los tiempos de 5, 15 y 30 segundos.

Tabla N°18 Resumen de cálculos para parámetro de reproducibilidad de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos						
DATOS						
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10%						
Parámetro de estudio: Reproducibilidad						
Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%						
Código de muestra: MY102022						
Criterio de aceptación: $R < 3\%$						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
Tiempo s	S1	S2	DSR1 ²	DSR2 ²	% Reproducibilidad	Cumple/ no cumple
5s	-	-	-	-	-	-
15s	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	Cumple
30s	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	Cumple
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229						
Tiempo s	S1	S2	DSR1 ²	DSR2 ²	% Reproducibilidad	Cumple/ no cumple
5s	28.0957	35.7919	0.5146	0.6822	88.4255	No cumple
15s	23.4066	18.0194	0.0965	0.0455	30.4601	No cumple
30s	0.5477	1.2649	3.0302E-05	0.0002	1.1245	Cumple

En la Tabla N°18 se encuentran detallados los cálculos de “S” y “DSR” de cada analista, S1 y DSR1 corresponde al analista 1, S2 y DSR2 corresponden al analista 2, esta serie de datos fueron utilizados en la determinación de los porcentajes de reproducibilidad en los diferentes tiempos de acción para cada bacteria.

Los ensayos de efectividad antimicrobiana de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* al ser comparados entre el analista 1 y 2 demuestran ser reproducibles en los tiempos de 15 y 30 segundos con un porcentaje de reproducibilidad del 0.0% ya que no existe variación entre los resultados obtenidos, cumpliendo así con el criterio de aceptación el cual indica un porcentaje de reproducibilidad menor al 3% y para el tiempo de 5 segundos no aplica, debido a que los datos obtenidos de recuento no pudieron ser contables, por lo tanto, fue imposible llevar a cabo el cálculo de reproducibilidad.

Para los ensayos realizados de efectividad antimicrobiana de la yodopovidona 10% frente a *Escherichia coli* entre ambos analistas demuestran ser reproducibles a los 30 segundos de acción con un porcentaje de reproducibilidad del 1.1245%, caso contrario para los tiempos de 5 y 15 segundos con porcentajes de reproducibilidad mayor al 3% ⁽¹⁵⁾.

Para que el parámetro de reproducibilidad sea aprobado los resultados de ambos analistas deben cumplir con el criterio de aceptación para reproducibilidad con ambos microorganismos. Por lo tanto, con los resultados detallados se puede confirmar que se cumplió con lo establecido en el criterio de aceptación para el tiempo de 30 segundos y la muestra de yodopovidona 10%.

5.6.3 Parámetro de recuperación para ensayo de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

El procedimiento para el ensayo de recuperación siguió el mismo procedimiento de comprobación de efectividad antimicrobiana con la diferencia que la muestra fue inactivada en un tiempo cero es decir que el antiséptico no generó su mecanismo de acción frente al microorganismo de prueba ya que, lo que se busca es evaluar la recuperación del microorganismo bajo las mismas condiciones de ensayo. Los resultados demostraron el porcentaje de recuperación de cada microorganismo tomando como referencia la concentración viable inicial (CV) obtenida. La prueba exige demostrar la recuperación de cada microorganismo en presencia de yodopovidona 10% por analista. Ver tabla N°19 y tabla N°20

Tabla N°19. Resultados para el cálculo del porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos				
DATOS				
Parámetro de estudio: Recuperación				
Código de muestra: MY102022				
Analista 1: Carlos Javier Juárez López				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.3010	7.2955	99.9	Cumple
Criterio de aceptación	90-110%			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.6097	98.8	Cumple
Criterio de aceptación	90-110%			

Tabla N°20. Cálculo del porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229 por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos				
DATOS				
Parámetro de estudio: Recuperación				
Código de muestra: MY102022				
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} el log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.30103	7.2106	98.7616	Cumple
Criterio de aceptación	90-110%			
<i>Escherichia coli</i> ATCC11229				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} el log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.6347	99.1652	Cumple
Criterio de aceptación	90-110%			

La Tabla N°19 y Tabla N°20 muestran los diferentes datos necesarios para poder calcular el porcentaje de recuperación, se muestra la concentración viable “CV” determinada para cada microorganismo de prueba y sus valores calculados en logaritmo “Log de CV”, también se muestra la \bar{X} del log del recuento, el cual son los valores de la media de los recuentos de recuperación en términos de logaritmo ⁽¹⁵⁾.

La Tabla N°19 muestra los resultados obtenidos por el analista 1, los cuales demuestran los porcentajes de recuperación para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que son de 99.92% y 98.74% respectivamente. Para el analista 2 la Tabla N°20 detalla que para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* sus porcentajes de recuperación fueron del 98.76% y 99.16% respectivamente. El criterio de aceptación para este parámetro es de un porcentaje de recuperación de 90-110% ⁽¹⁵⁾, por lo tanto, en ambos casos se cumplió con tal criterio.

El cumplimiento de este parámetro indica que la realización del método bajo las condiciones específicas de pruebas no es impedimento para la recuperación del microorganismo ya que el único factor que debe afectar el crecimiento microbiana es el mecanismo de acción del antiséptico.

5.6.4 Sesgo del ensayo de Yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229.

Los resultados obtenidos del análisis del sesgo de yodopovidona frente a los microorganismos de prueba se observan en la tabla N°21 y tabla N°22

Tabla N°21. Resultados de sesgo para el ensayo de yodopovidona 10% en presencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Sesgo						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
Muestra: Yodopovidona 10%						
Código de muestra: MY102022						
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-I/	Cumple/No cumple
1	37	30.0	3.0E+07	7.4771	0.18	CUMPLE
	23					
2	20	24.5	2.5E+07	7.3892	0.09	CUMPLE
	29					
3	26	22.5	2.3E+07	7.3522	0.05	CUMPLE
	19					
4	37	36.5	3.7E+07	7.5623	0.26	CUMPLE
	36					
5	20	25.0	2.5E+07	7.3979	0.10	CUMPLE
	30					
6	18	21.0	2.1E+07	7.3222	0.02	CUMPLE
	24					
Criterio	Concentración inoculada (I)		Log de I			
<0.3 log	2.0E+07		7.3010			
Observaciones:						

Tabla N°22. Sesgo de los ensayos de yodopovidona 10% en presencia de *Escherichia coli* ATCC 11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Sesgo						
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez						
Muestra: Yodopovidona 10%						
Código de muestra: MCY102022						
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-I/	Cumple/ No cumple
1	46	43.0	4.3E+07	7.6335	0.07	CUMPLE
	40					
2	51	48.5	4.9E+07	7.6857	0.02	CUMPLE
	46					
3	52	49.5	5.0E+07	7.6946	0.01	CUMPLE
	47					
4	47	41.5	4.2E+07	7.6181	0.08	CUMPLE
	36					
5	39	36.5	3.7E+07	7.5623	0.14	CUMPLE
	34					
6	42	40.0	4.0E+07	7.6021	0.10	CUMPLE
	38					
Criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	5.0E+07			7.7011		
observaciones:						

El analista 1 evaluó la determinación de sesgo con *Staphylococcus aureus*, se hizo uso de la concentración inoculada que corresponde la concentración viable CV posteriormente conocida y la concentración recuperada ambas concentraciones en términos de logaritmo, se obtuvieron valores menores a 0.3 log para cada porción de muestra, por lo tanto, para el ensayo realizado en cada una de las porciones dan cumplimiento con el criterio de aceptación para tal parámetro.

El analista 2 evaluó la determinación de sesgo con *Escherichia coli*, se hizo uso de la concentración inoculada que corresponde la concentración viable CV posteriormente conocida y la concentración recuperada ambas concentraciones

en términos de logaritmo, se obtuvieron valores menores a 0.3 log para cada porción de muestra ⁽¹⁵⁾, por lo tanto, para el ensayo realizado en cada una de las porciones dan cumplimiento con el criterio de aceptación para tal parámetro.

Los resultados obtenidos por ambos analistas dan cumplimiento al criterio de aceptación donde la diferencia absoluta de lo inoculado y lo recuperado es <0.3 log. Este valor ayuda a escatimar posibles datos erróneos en los ensayos de efectividad antimicrobiana ya que al existir un sesgo tan dentro del criterio de aceptación, no pone en dudas los resultados obtenidos por un factor interferente en el desarrollo de la prueba.

5.7 Recopilación de parámetros de desempeño para clorhexidina 4% y yodopovidona 10%

La tabla N°23 y N°24 detallan los resultados obtenidos de la propuesta de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% respectivamente. Se recopiló la información de acuerdo a los parámetros de desempeño evaluando el cumplimiento de cada uno de ellos para validar el método de estudio. La metodología implementada debe cumplir con los criterios de aceptación cuando la muestra se pone a prueba con *Staphylococcus aureus* ATCC 6530 y *Escherichia Coli* ATCC 11229, el comportamiento de la muestra se evaluó en los tiempos de acción de 5, 15 y 30 segundos.

5.7.1 Recopilación de resultados de parámetros de clorhexidina 4%.

En la Tabla N°23 se encuentra la recopilación de los resultados obtenidos para cada parámetro cuando se evalúa clorhexidina 4% frente a los microorganismos de prueba.

Tabla N°23. Resultados de parámetros de validación de clorhexidina 4%.
(Fuente: Elaboración propia)

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD ÁREA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO				
DATOS:				
Método: Efectividad Antimicrobiana				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Analista 1: Carlos Javier Juárez López				
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez				
PARÁMETROS DE VALIDACIÓN				
Repetibilidad				
Criterio	Tiempos	Resultado (%)		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
r < 3%	5	1279.0413	40.0435	NO CUMPLE
	15	19.1236	0.4674	NO CUMPLE
	30	2.3529	0.5923	CUMPLE
Reproducibilidad				
Criterio	Tiempos	Resultado (%)		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
R < 3%	5	929.0370	28.8976	NO CUMPLE
	15	19.0823	0.3305	NO CUMPLE
	30	1.8889	0.4188	CUMPLE
Recuperación				
Criterio	Analista	Resultado (%)		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
90% - 110%	1	101.3475	97.9085	CUMPLE
	2	99.1190	99.1668	
Sesgo				
Criterio	Analista	Resultado (log)		Dictamen
		S. aureus (1)	E. coli (2)	
<0.3 log	1 y 2	0.03	0.05	CUMPLE
		0.03	0.04	CUMPLE
		0.14	0.09	CUMPLE
		0.05	0.10	CUMPLE
		0.16	0.12	CUMPLE
		0.04	0.07	CUMPLE

Para demostrar repetibilidad en los resultados se debe obtener un porcentaje menor al 3% cuando se evalúa clorhexidina 4% frente a los microorganismos de prueba. En un tiempo de contacto de 5 segundos para S. aureus y E. coli se

obtienen un porcentaje de repetibilidad de 1270.0413% y 40.0435% respectivamente, estando fuera del criterio de aceptación, por lo tanto, se dictamina el no cumplimiento. Cuando se analiza un tiempo de acción de 15 segundos de la muestra en presencia de *S. aureus* da como resultado una repetibilidad del 19.1236% estando fuera de especificación, en presencia de *E. coli* cumple con el criterio con un 0.4674% de repetibilidad, pero para dictaminar el cumplimiento debe ser para ambos microorganismos, por lo tanto, no cumple. Cuando se analiza un tiempo de contacto de 30 segundos se demuestra repetibilidad frente a los dos microorganismos de prueba con resultados menores al 3%.

Para la evaluación de reproducibilidad se consideró los resultados de los dos analistas cuando ponen a prueba la efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% bajo las indicaciones de la propuesta del protocolo de validación, el criterio que se debe cumplir en este parámetro es una reproducibilidad menor al 3%. Los resultados obtenidos indican que no se logran condiciones de reproducibilidad en los tiempos de 5 y 15 segundos al no cumplir con el criterio de aceptación en la evaluación de efectividad antimicrobiana frente a los dos microorganismos de prueba. Para 30 segundos con un porcentaje de reproducibilidad de 1.8889% para *S. aureus* y 0.4188% para *E. coli*, se dictamina el cumplimiento para este parámetro.

El parámetro de recuperación se realiza bajo las mismas condiciones de prueba para evaluar repetibilidad y reproducibilidad con la variante que a la muestra se le inactiva su propiedad germicida en un tiempo cero, esto se hace con el fin de evaluar si la metodología aplicada no presenta alguna interferencia que impida la recuperación del inóculo inicial, ya que se busca evaluar la efectividad antimicrobiana de la muestra sobre el microorganismo de prueba. El criterio a cumplir es una recuperación entre el 90% y 110% de inóculo inicial. Los resultados obtenidos evidencian una recuperación de 101.3475% para *S. aureus*

y del 97.9085% para *E. coli* cuando son evaluados por el analista 1, el analista 2 obtiene una recuperación de 99.1190% para *S. aureus* y 99.1668% para *E. coli*, por lo tanto, la recuperación de los microorganismos bajo condiciones de prueba está dentro del criterio de aceptación, dictaminando el cumplimiento de este parámetro.

Para evaluar el parámetro de sesgo se hace bajo las mismas condiciones de prueba que el parámetro de recuperación, la diferencia radica en el cálculo para cumplir este parámetro, ya que se busca el sesgo que existe entre los valores absolutos de lo inoculado y lo recuperado en términos de logaritmo, el criterio de aceptación es un sesgo menor a 0.3 log. Se realizan 6 ensayos por uno de los analistas donde los resultados son menores a 0.3 log dando cumplimiento a este parámetro de estudio.

5.7.2 Recopilación de resultados de parámetros de yodopovidona 10%

La evaluación de yodopovidona 10% se realiza bajo las mismas condiciones de prueba que clorhexidina 4%, criterios y especificaciones descritas en el punto 5.7.1 aplican para el análisis de los resultados de la tabla N°24.

Tabla N°24. Resultados de parámetros de validación de yodopovidona 10%.
(Fuente: Elaboración propia)

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD ÁREA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO				
DATOS:				
Método: Efectividad Antimicrobiana				
Muestra: Yodopovidona 10%				
Analista 1: Carlos Javier Juárez López				
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez				
PARÁMETROS DE VALIDACIÓN				
Repetibilidad (%)				
Criterio	Tiempos	Resultado		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
r < 3%	5	-	81.9984	NO CUMPLE
	15	0	35.5167	NO CUMPLE
	30	0	0.6292	CUMPLE
Reproducibilidad (%)				
Criterio	Tiempos	Resultado		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
R < 3%	5	-	88.4255	NO CUMPLE
	15	0	30.4601	NO CUMPLE
	30	0	1.1245	CUMPLE
Recuperación (%)				
Criterio	Analista	Resultado		Dictamen
		S. aureus	E. coli	
90% - 110%	1	99.9000	98.8000	CUMPLE
	2	98.7616	99.1653	
Sesgo (log)				
Criterio	Analista	Resultado		Dictamen
		S. aureus (1)	E. coli (2)	
<0.3 log	1 y 2	0.18	0.07	CUMPLE
		0.09	0.02	CUMPLE
		0.05	0.01	CUMPLE
		0.26	0.08	CUMPLE
		0.10	0.14	CUMPLE
		0.02	0.10	CUMPLE

El primer reto fue evaluar la repetibilidad del método en cada uno de los tiempos de acción, cuando se evalúa un tiempo de 5 segundos se observa que para *S. aureus* el recuento en placa da como resultado demasiado numeroso para contar las colonias de microorganismos por lo que no se reporta un resultado y en el caso de la evaluación en presencia de *E. coli* se encuentra fuera del criterio de aceptación. Cuando evaluamos un tiempo de 15 segundos la muestra en

presencia de *S. aureus* da como resultado un 0% indicando que no existe variación entre resultados, pero para *E. coli* se observa un 35.5167% de repetibilidad siendo mayor al 3%, incumpliendo el criterio de aceptación. Cuando se evalúan 30 segundos de contacto en el caso de los dos microorganismos se observa una repetibilidad menor al 3 %, por lo tanto, cumple.

La reproducibilidad en la evaluación de yodopovidona frente a ambos microorganismos de prueba solo se logró en un tiempo de 30 segundos con porcentajes de 0% poniendo a prueba *S. aureus* y del 1.1245% frente a *E. coli*, dando cumplimiento al criterio y demostrando reproducibilidad del método. El tiempo de 5 y 15 segundos se dictamina el no cumplimiento del parámetro al no estar dentro del criterio de aceptación la evaluación con ambos microorganismos de prueba.

Las condiciones generadas para evaluar la recuperación de los microorganismos de prueba por los analistas son favorables al obtener porcentajes de recuperación dentro de criterio de aceptación. El analista uno con porcentajes de 99.90% para *S. aureus* y 98.80% para *E. coli*, el analista dos con 98.7616% para *S. aureus* y 99.1653% para *E. coli*. Por lo tanto, cumple con este parámetro.

El sesgo en cada uno de los ensayos realizados en la evaluación de yodopovidona 10% es menor a 0.3 en términos de logaritmo, cumpliendo con el criterio de aceptación para este parámetro.

5.8 INFORME DE VALIDACION

Logo	PROPUESTA DE INFORME DE VALIDACION PARA COMPROBAR LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CLORHEXIDINA 4% Y YODOPOVIDONA 10%.		Fecha: xx-xx-xx
	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD Área de Análisis Microbiológico		Página – de -
Objetivo			
Demostrar a través de parámetros de validación que el análisis de los antisépticos clorhexidina 4% y yodopovidona 10% cumplen con su uso previsto por medio de una metodología para comprobar la efectividad antimicrobiana en productos germicidas.			
Alcance			
Comprobar experimentalmente la eficacia antimicrobiana de los antisépticos de uso hospitalario Clorhexidina 4% y Yodopovidona 10% en solución jabonosa, haciendo uso de una metodología dada por la normativa mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 para la DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS GERMICIDAS y validarla mediante el cumplimiento de los parámetros dados por la POLÍTICA 9.4 PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS, del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA).			
Responsables			
Nombre		Cargo	Firma
Br. William Alexander Ramos Ramírez		Analista	
Br. Carlos Javier Juárez López		Analista	
Autorizado por:			
Lic. Edwin Eliú Alvanez Umaña		Asesor	
Lic. Julio Cesar Henríquez Pérez		Asesor	
MATERIALES Y EQUIPOS			
Equipos		Materiales	
<ul style="list-style-type: none"> - Espectrómetro UV/visible - Agitador vortex - Micropipeta 1000 µL - Cabina de Bioseguridad 		<ul style="list-style-type: none"> - Erlenmeyer 250 mL estériles - Beaker 100 mL estéril - Beaker 200 mL estéril - Tubos de ensayo con tapón estériles - Puntas para micropipeta estériles - Placas Petri desechables estériles - Gradilla para tubos de ensayo - Celdas para espectrofotómetro - Frasco descarte - Pipetas volumétricas 9 mL - Probeta 100 mL - Perlas de ebullición - Válvula de 3 vías 	

Medios de Cultivo
<ul style="list-style-type: none"> - Caldo Neutralizante (Dey-Engley) - Agar Trypticase Soya - Caldo Casoy - Solución Salina 0.9% Estéril - Agua destilada estéril

ESTANDARIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CUENTA VIABLE INICIAL DE <i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 6538 Y <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229					
Determinación de la cuenta viable (CV) de los microorganismos					
Cuenta viable inicial de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538					
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Estandarización de Cepas de Referencia.					
Datos					
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538					
Ensayo: Calculo de cuenta viable inicial					
Analistas Responsables: Carlos Javier Juárez López William Alexander Ramos Ramírez					
Analista	% de Transmitancia	Dilución	UFC	\bar{X} UFC	\bar{X} CV (UFC/mL)
Carlos	3%	10 ⁻⁶	21	22.5	2.0x10 ⁷
			24		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	23	21	
			19		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	20	21	
			22		
William	3%	10 ⁻⁶	15	16	
			17		
William	3%	10 ⁻⁶	22	20	
			18		
William	3%	10 ⁻⁶	21	19.5	
			18		
Observaciones:			Suma	120	
			Promedio	20	

Cuenta viable inicial de *Escherichia coli* ATCC 11229

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Estandarización de Cepas de Referencia.

Datos**Microorganismo:** *Escherichia coli* ATCC11229**Ensayo:** Calculo de cuenta viable inicial**Analistas Responsables:**

Carlos Javier Juárez López

William Alexander Ramos Ramírez

Analista	% de Transmitancia	Dilución	UFC	\bar{X} UFC	\bar{X} CV (UFC/mL)
Carlos	3%	10 ⁻⁶	50	49.5	5.0x10 ⁷
			49		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	39	40.5	
			42		
Carlos	3%	10 ⁻⁶	57	57	
			57		
William	3%	10 ⁻⁶	48	46.5	
			45		
William	3%	10 ⁻⁶	52	54.5	
			57		
William	3%	10 ⁻⁶	52	53.5	
			55		
Observaciones:			Suma	301.5	
			Promedio	50	

**EFICACIA ANTIMICROBIANA CON CLORHEXIDINA 4%
PORCENTAJE DE REDUCCION**

ANALISTA: 01

MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Efectividad Antimicrobiana**

DATOS

Analista: Carlos Javier Juárez López

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10 ⁻⁶	24	13	0	21.5	11	1	-7	45	95
			19	9	2						
2	3%	10 ⁻⁶	16	8	0	21	10	0	-5	50	100
			26	12	0						
3	3%	10 ⁻⁶	24	9	0	23	10.5	0	-15	48	100
			22	12	0						
4	3%	10 ⁻⁶	22	11	0	20	12.5	0	0	38	100
			18	14	0						
5	3%	10 ⁻⁶	19	12	0	19.5	10	1	3	50	95
			20	8	2						
6	3%	10 ⁻⁶	20	7	0	16.5	7.5	0	18	63	100
			13	8	0						

Observaciones:

ANALISTA 02**MICROORGANISMO:** *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana**

Datos**Analista:** William Alexander Ramos Ramírez**Código de muestra:** MCL42022**Microorganismo:** *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10 ⁻⁶	19	9	0	17	11	0	15	45	100
			15	13	0						
2	3%	10 ⁻⁶	16	9	1	17	10	0.5	15	50	98
			18	11	0						
3	3%	10 ⁻⁶	15	10	0	18.5	13	0.5	8	35	98
			22	16	1						
4	3%	10 ⁻⁶	25	11	0	19.5	9	0	3	55	100
			14	7	0						
5	3%	10 ⁻⁶	33	8	1	23.5	10	0.5	-17	50	98
			14	12	0						
6	3%	10 ⁻⁶	24	10	0	19.5	8.5	0	3	58	100
			15	7	0						

Observaciones:

ANALISTA: 01

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana**

DATOS

Analista: Carlos Javier Juárez López

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-1}	13	0	0	10.5	0	0	100	100	100
			8	0	0						
2	3%	10^{-1}	34	1	0	30	0.5	0	100	100	100
			26	0	0						
3	3%	10^{-1}	18	0	0	21.5	0	0	100	100	100
			25	0	0						
4	3%	10^{-1}	58	2	0	49.5	1	0	100	100	100
			41	0	0						
5	3%	10^{-1}	8	0	0	8.5	0	0	100	100	100
			9	0	0						
6	3%	10^{-1}	15	0	0	16	0	0	100	100	100
			17	0	0						

Observaciones:

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana**

DATOS

Analista: William Alexander Ramos Ramírez

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-1}	13	0	0	35.5	0	0.5	29	100	99
			58	0	1						
2	3%	10^{-1}	11	0	0	8.5	0.5	0	83	99	100
			6	1	0						
3	3%	10^{-1}	1	0	1	0.5	0	0.5	99	100	99
			0	0	0						
4	3%	10^{-1}	2	0	0	1.5	0	0	97	100	100
			1	0	0						
5	3%	10^{-1}	13	0	0	16	0	0	68	100	100
			19	0	0						
6	3%	10^{-1}	21	0	0	16.5	0	0	67	100	100
			12	0	0						

Observaciones:

RESULTADOS Y CALCULOS DE PARAMETROS DE VALIDACION PARA CLORHEXIDINA 4%										
REPETIBILIDAD										
ANALISTA: 01										
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538										
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista: Carlos Javier Juárez López										
Código de muestra: MCL42022										
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538										
Analista	Ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-7	45	95	-6	-4	-3.3333	36	16	11.1
	2	-5	50	100	-4	1	1.6667	16	1	2.78
	3	-15	48	100	-14	-1	1.6667	196	1	2.78
	4	0	38	100	1	-11	1.6667	1	121	2.78
	5	3	50	95	4	1	-3.3333	16	1	11.1
	6	18	63	100	19	14	1.6667	361	196	2.78
	\bar{X}	-1	49	98.3333	TOTAL			626	336	33.3
Cálculo del % de Repetibilidad										
Tiempo s	S1	DSR 1 ²		% Repetibilidad		Cumple/ No cumple				
5s	11.1892	125.2		904.4187		No cumple				
15s	8.1975	0.0279		13.5224		No cumple				
30s	2.5819	0.00068		2.1223		Cumple				

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Repetibilidad**

DATOS

Analista: William Alexander Ramos Ramírez

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Analista	Ensayo	% reducción (Xi)			(Xi-X̄)			(Xi-X̄) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	5s	15s	30s	30s
William	1	29	100	99	- 44.833	0.16 7	- 0.66 667	2010	0.028	0.44
	2	83	99	100	9.1666	-0.83	0.33 333	84	0.694	0.11
	3	99	100	99	25.166 7	0.16 7	- 0.66 667	633	0.028	0.44
	4	97	100	100	23.166 7	0.16 7	0.33 333	537	0.028	0.11
	5	68	100	100	- 5.8333	0.16 7	0.33 333	34	0.028	0.11
	6	67	100	100	- 6.8333	0.16 7	0.33 333	46.7	0.028	0.11
	X̄	73. 833 3	99. 833 3	99. 666 6	TOTAL			3345	0.833	1.33

Cálculo del % de Repetibilidad

Tiempo s	S1	DSR 1 ^{^2}	% Repetibilidad	Cumple/ No cumple
5s	25.8643	0.1227	28.3150	No cumple
15s	0.4082	1.6722E-05	0.3305	CUMPLE
30s	0.51639	2.6845E-05	0.4187	CUMPLE

REPRODUCIBILIDAD

MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Reproducibilidad**

DATOS

Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%

Código de muestra: MCL42022

Criterio de aceptación: $R < 3\%$

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Analistas:

Carlos Javier Juárez López

William Alexander Ramos Ramírez

Analista 1	Ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos Juárez	1	-7	45	95	-6	-4	-3.3333	36	16	11.1
	2	-5	50	100	-4	1	1.6666	16	1	2.78
	3	-15	48	100	-14	-1	1.6666	196	1	2.78
	4	0	38	100	1	-11	1.6666	1	121	2.78
	5	3	50	95	4	1	-3.3333	16	1	11.1
	6	18	63	100	19	14	1.6666	361	196	2.78
	\bar{X}	-1	49	98.3 333	TOTAL			626	336	33.3

Analista 2	Ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William Ramos	1	15	45	100	10.5	-3.83	1	110	14.69	1
	2	15	50	98	10.5	1.167	-1	110	1.361	1
	3	8	35	98	3.5	-13.8	-1	12.3	191.4	1
	4	3	55	100	-1.5	6.167	1	2.25	38.03	1
	5	-17	50	98	-21.5	1.167	-1	462	1.361	1
	6	3	58	100	-1.5	9.167	1	2.25	84.03	1
	\bar{X}	4.5	48. 833 3	99	TOTAL			700	330.8	6

Cálculo del % de Reproducibilidad						
Tiempo s	S1	S2	DSR 1 ^{^2}	DSR 2 ^{^2}	% Reproducibilidad	Cumple
5s	11.1893	11.8279	125.2	6.9086	929.0370	No cumple
15s	8.19756	8.13429	0.02798	0.0277	19.0822	No cumple
30s	2.5819	1.0954	0.00068	0.00012	2.3031	Cumple

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
Datos										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4%										
Parámetro de estudio: Reproducibilidad										
Código de muestra: MCL42022										
Criterio de aceptación: R < 3%										
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229										
Analista 1: Carlos Javier Juárez López										
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Analista 1	Ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi-X)			(Xi-X) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos Juárez	1	100	100	100	2.83333	0	0	8.03	0	0
	2	100	100	100	2.83333	0	0	8.03	0	0
	3	100	100	100	2.83333	0	0	8.03	0	0
	4	100	100	100	2.83333	0	0	8.03	0	0
	5	83	100	100	-14.167	0	0	201	0	0
	6	100	100	100	2.83333	0	0	8.03	0	0
	\bar{X}	97.1667	100	100	TOTAL			241	0	0

Analista 2	Ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William Ramos	1	29	100	99	- 44.8 33	0.16 7	- 0.66 667	2010	0.0 28	0.44
	2	83	99	100	9.16 667	-0.83	0.33 333	84	0.6 94	0.11
	3	99	100	99	25.1 667	0.16 7	- 0.66 667	633	0.0 28	0.44
	4	97	100	100	23.1 667	0.16 7	0.33 333	537	0.0 28	0.11
	5	68	100	100	- 5.83 33	0.16 7	0.33 333	34	0.0 28	0.11
	6	67	100	100	- 6.83 33	0.16 7	0.33 333	46.7	0.0 28	0.11
	\bar{X}	73. 833 3	99.833 33	99.66 6667	TOTAL			3345	0.8 33	1.33

Cálculo del % de Reproducibilidad						
Tiempo	S1	S2	DSR 1 ^{^2}	DSR 2 ^{^2}	% Reproducibilidad	Cumple/ No cumple
5s	6.9402	25.864	0.0051	0.1227	28.8976	NO CUMPLE
15s	0	0.4082	0	1.672E-05	0.3305	CUMPLE
30s	0	0.5164	0.0000	2.685E-05	0.4187	CUMPLE

RECUPERACION				
ANALISTA: 01				
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538				
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
DATOS				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶ (UFC/mL)	Log del recuento
1	30	27	2.7E+07	7.4313
	24			
2	18	22.5	2.3E+07	7.3521
	27			
3	28	27	2.7E+07	7.4313
	26			
4	28	24.5	2.5E+07	7.3891
	21			
5	17	20	2.0E+07	7.3010
	23			
6	27	31	3.1E+07	7.4913
	35			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.3010	7.3994	101.3474	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶ (UFC/mL)	Log del recuento
1	32	30	3.0E+07	7.4771
	28			
2	44	40.5	4.1E+07	7.6074
	37			
3	36	32.5	3.3E+07	7.5118
	29			
4	36	34.5	3.5E+07	7.5378
	33			
5	42	40	4.0E+07	7.6020
	38			
6	36	31	3.1E+07	7.4913
	26			
Cálculo del % Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% Recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.5379	97.9085	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Datos				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC/mL)	Promedio de recuento	10 ⁶ (UFC/mL)	Log del recuento
1	15	15	1.5E+07	7.1760
	15			
2	14	19	1.9E+07	7.2787
	24			
3	17	19	1.9E+07	7.2787
	21			
4	19	20	2.0E+07	7.3010
	21			
5	10	18	1.8E+07	7.2552
	26			
6	17	13.5	1.4E+07	7.1303
	10			
Cálculo del % Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.3010	7.2367	99.1189	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Recuperación**

Analista: William Alexander Ramos Ramírez.

Muestra: Clorhexidina 4%

Código de muestra: MCL42022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC 11229

Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC/mL)	Promedio de recuento	10 ⁶ (UFC/mL)	Log del recuento
1	39	38.5	3.9E+07	7.5854
	38			
2	44	40	4.0E+07	7.6020
	36			
3	39	48	4.8E+07	7.6812
	57			
4	49	44.5	4.5E+07	7.6483
	40			
5	46	44	4.4E+07	7.6434
	42			
6	49	44.5	4.5E+07	7.6483
	40			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% Recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.6348	99.1668	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

SESGO						
ANALISTA: 01						
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador Área de Análisis Microbiológico de Medicamentos						
Datos						
Parámetro de estudio: Sesgo						
Código de muestra: MCL42022						
Microorganismo de prueba: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	Log/R-I	Cumple/ No cumple
1	23	21.5	2.2E+0	7.3324	0.03	Cumple
	20		7			
2	19	21.5	2.2E+0	7.3324	0.03	Cumple
	24		7			
3	26	27.5	2.8E+0	7.4393	0.14	Cumple
	29		7			
4	19	18	1.8E+0	7.2553	0.05	Cumple
	17		7			
5	23	29	2.9E+0	7.4624	0.16	Cumple
	35		7			
6	22	22	2.2E+0	7.3424	0.04	Cumple
	22		7			
Criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	2.0E+07 UFC/mL			7.3010		

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico**

Datos

Parámetro de estudio: Sesgo
Código de muestra: MCL42022
Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229
Analista 2: William Alexander Ramos Ramirez

N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-I/	Cumple/ No cumple
1	44	45	4.5E+07	7.6532	0.05	Cumple
	46					
2	48	46	4.6E+07	7.6627	0.04	Cumple
	44					
3	46	40.5	4.1E+07	7.6074	0.09	Cumple
	35					
4	41	39.5	4.0E+07	7.5965	0.10	Cumple
	38					
5	36	38	3.8E+07	7.5797	0.12	Cumple
	40					
6	48	42.5	4.3E+07	7.6283	0.07	Cumple
	37					
criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	5.0E+07			7.70113607		

EFICACIA ANTIMICROBIANA CON YODOPOVIDONA 10% PORCENTAJE DE REDUCCION											
ANALISTA: 01											
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538											
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
Datos											
Analista: Carlos Javier Juárez López.											
Código de muestra: MCY102022											
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538											
Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
1	3%	10 ⁻²	DNPC	762	0	DNPC	840	0	-	100	100
			DNPC	918	0						
2	3%	10 ⁻²	DNPC	42	0	DNPC	33	0	-	100	100
			DNPC	24	0						
3	3%	10 ⁻²	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
4	3%	10 ⁻²	DNPC	50	0	DNPC	45.5	0	-	100	100
			DNPC	41	0						
5	3%	10 ⁻²	DNPC	1	0	DNPC	3.5	0	-	100	100
			DNPC	6	0						
6	3%	10 ⁻²	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
Observaciones											

ANALISTA: 02

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana

DATOS

Analista: William Alexander Ramos Ramírez

Código de muestra: MY102022

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
1	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
2	3%	10^{-2}	DNPC	249	0	DNPC	228	0	-	100	100
			DNPC	207	0						
3	3%	10^{-2}	DNPC	29	0	DNPC	32	0	-	100	100
			DNPC	35	0						
4	3%	10^{-2}	DNPC	57	0	DNPC	53.5	0	-	100	100
			DNPC	50	0						
5	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
6	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						

Observaciones:

ANALISTA: 01

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana**

DATOS

Analista: Carlos Javier Juárez López

Código de muestra: MY102022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-6}	48	35	0	50.5	33.5	0.5	-1	33	99
			53	32	1						
2	3%	10^{-6}	34	17	0	30	14	0.5	40	72	99
			26	11	1						
3	3%	10^{-6}	17	4	0	13.5	4	0.5	73	92	99
			10	4	1						
4	3%	10^{-6}	42	13	0	39.5	13.5	0	21	73	100
			37	14	0						
5	3%	10^{-6}	33	11	0	33	9	0	34	82	100
			33	7	0						
6	3%	10^{-6}	15	0	0	16	0	0	68	100	100
			17	0	0						

Observaciones:

ANALISTA: 02

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana

DATOS**Analista:** William Alexander Ramos Ramírez**Código de muestra:** MY102022**Microorganismo:** *Escherichia coli* ATCC11229

Ensayo	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5 s	15 s	30s
1	3%	10^{-6}	63	19	0	61	20	0.5	-22	60	99
			59	21	1						
2	3%	10^{-6}	23	17	3	20.5	16	1.5	59	68	97
			18	15	0						
3	3%	10^{-6}	17	15	2	18.5	10.5	1	63	79	98
			20	6	0						
4	3%	10^{-6}	34	0	0	37.5	0	0	25	100	100
			41	0	0						
5	3%	10^{-6}	13	0	0	16	0	0	68	100	100
			19	0	0						
6	3%	10^{-6}	21	0	0	16.5	0	0	67	100	100
			12	0	0						

Observaciones:

RESULTADOS Y CALCULOS DE PARAMETROS DE VALIDACION PARA YODOPOVIDONA 10%										
REPETIBILIDAD										
ANALISTA: 02										
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538										
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Código de muestra: MCY102022										
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538										
Analista	Ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi - \bar{X})			(Xi - \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	Promedio	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Cálculo del % de Repetibilidad										
Tiempo s	S1	DSR 1 ²		% Repetibilidad			Cumple/ No cumple			
5s	-	-		-			-			
15s	0	0		0			CUMPLE			
30s	0	0		0			CUMPLE			

ANALISTA: 01

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Repetibilidad**

DATOS

Analista: Carlos Javier Juárez López

Código de muestra: MY102022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Analista	Ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-1	33	99	40.167	-42.3	0.5	1613	1792	0.25
	2	40	72	99	0.83333	-3.33	0.5	0.69	11.11	0.25
	3	73	92	99	33.8333	16.67	0.5	1145	277.8	0.25
	4	21	73	100	18.167	-2.33	0.5	330	5.444	0.25
	5	34	82	100	5.1667	6.667	0.5	26.7	44.44	0.25
	6	68	100	100	28.8333	24.67	0.5	831	608.4	0.25
	\bar{X}	39.16	75.33	99.5	TOTAL			3947	2739	1.5
Cálculo del % de Repetibilidad										
Tiempo s	S1	DSR 1 ²		% Repetibilidad		Cumple/ No cumple				
5s	28.0956	0.5145		57.9815		No cumple				
15s	23.4065	0.0965		25.1141		No cumple				
30s	0.5477	3.0302E-05		0.4449		CUMPLE				

REPRODUCIBILIDAD										
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538										
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
DATOS										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10% Parámetro de estudio: Reproducibilidad Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10% Código de muestra: MY102022 Criterio de aceptación: $R < 3\%$ Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 Analista 1: Carlos Javier Juárez López Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Analista 1	Ensayo	% de reducción (Xi)			$(Xi-\bar{X})$			$(Xi-\bar{X})^2$		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	\bar{X}	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Analista 2	Ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	\bar{X}	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Cálculo del %Reproducibilidad										
Tiempo s	S1	S2	DSR 1^2	DSR 2^2	% Reproducibilidad		Cumple/ No cumple			
5s	-	-	-	-	-		-			
15s	0	0	0	0	0		CUMPLE			
30s	0	0	0.0000	0	0		CUMPLE			

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Reproducibilidad**

DATOS

Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10%

Parámetro de estudio: Reproducibilidad

Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%

Código de muestra: MY102022

Criterio de aceptación: $R < 3\%$

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC11229

Analista 1: Carlos Javier Juárez López

Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez

Analista	Ensayo	%Reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-1	33	99	-40.16	-42.3	-0.5	1613	1792	0.25
	2	40	72	99	0.83	-3.33	-0.5	0.69	11.11	0.25
	3	73	92	99	33.83	16.67	-0.5	1145	277.8	0.25
	4	21	73	100	-18.167	-2.33	0.5	3307	5.444	0.25
	5	34	82	100	-5.16	6.667	0.5	26.7	44.44	0.25
	6	68	100	100	28.83	24.67	0.5	831	608.4	0.25
	\bar{X}	39.1667	75.33	99.5	TOTAL			3947	2739	1.5
Analista	Ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William	1	-22	60	99	-65.333	-24.5	0	4268	600.3	0
	2	59	68	97	15.6667	-16.5	-2	245	272.3	4
	3	63	79	98	19.6667	-5.5	-1	387	30.25	1
	4	25	100	100	-18.333	15.5	1	336	240.3	1
	5	68	100	100	24.6667	15.5	1	608	240.3	1
	6	67	100	100	23.6667	15.5	1	560	240.3	1
	\bar{X}	43.333	84.5	99	TOTAL			6405	1624	8

Cálculo del % de Reproducibilidad						
Tiempo	S1	S2	DSR 1^{^2}	DSR 2^{^2}	% Reproducibilidad	Cumple/ No cumple
5s	28.0956	$\frac{35.79}{2}$	0.5145	0.6822	88.4254	NO CUMPLE
15s	23.4065	$\frac{18.01}{94}$	0.0965	0.0454	30.4601	NO CUMPLE
30s	0.5477	$\frac{1.264}{9}$	0.000030	0.00016	1.1245	CUMPLE

RECUPERACION				
ANALISTA: 01				
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538				
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶	Log del recuento
1	22	20.5	2.1E+07	7.3117
	19			
2	15	17	1.7E+07	7.2304
	19			
3	20	18	1.8E+07	7.2552
	16			
4	21	20.5	2.1E+07	7.3117
	20			
5	23	20.5	2.1E+07	7.3117
	18			
6	26	22.5	2.3E+07	7.3521
	19			
Cálculo % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	%Recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.3010	7.2955	99.9246	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

MICROORGANISMO: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Yodopovidona 10%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶	Log del recuento
1	44	43	4.3E+07	7.6334
	42			
2	46	38.5	3.9E+07	7.5854
	31			
3	39	41.5	4.2E+07	7.6180
	44			
4	48	41.5	4.2E+07	7.6180
	35			
5	31	35.5	3.6E+07	7.5502
	40			
6	46	45	4.5E+07	7.6532
	44			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% Recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.6097	98.8410	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Recuperación**

Datos

Analista: William Alexander Ramos Ramírez.

Muestra: Clorhexidina 4%

Código de muestra: MY102022

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶	Loga del recuento
1	15	18.5	1.9E+07	7.2671
	22			
2	14	13.5	1.4E+07	7.1303
	13			
3	18	17.5	1.8E+07	7.2430
	17			
4	15	17	1.7E+07	7.2304
	19			
5	17	19	1.9E+07	7.2787
	21			
6	11	13	1.3E+07	7.1139
	15			

Cálculo del % de Recuperación

CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% Recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.3010	7.2106	98.7616	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		

Observaciones:

MICROORGANISMO: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Yodopovidona 10%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁶	Log del recuento
1	41	44	4.4E+07	7.6434
	47			
2	45	41	4.1E+07	7.6127
	37			
3	45	44.5	4.5E+07	7.6483
	44			
4	43	44.5	4.5E+07	7.6483
	46			
5	47	45	4.5E+07	7.6532
	43			
6	39	40	4.0E+07	7.6020
	41			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% Recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.6989	7.6347	99.1652	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

SESGO						
ANALISTA: 01						
MICROORGANISMO: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Sesgo						
Analista 1: Carlos Javier Juárez López						
Muestra: Yodopovidona 10%						
Código de muestra: MY102022						
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538						
N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-I/	Cumple/No cumple
1	37	30.0	3.0E+07	7.4771	0.18	CUMPLE
	23					
2	20	24.5	2.5E+07	7.3892	0.09	CUMPLE
	29					
3	26	22.5	2.3E+07	7.3522	0.05	CUMPLE
	19					
4	37	36.5	3.7E+07	7.5623	0.26	CUMPLE
	36					
5	20	25.0	2.5E+07	7.3979	0.10	CUMPLE
	30					
6	18	21.0	2.1E+07	7.3222	0.02	CUMPLE
	24					
critério	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	2.0E+07			7.3010		
Observaciones:						

ANALISTA: 02

MICROORGANISMO: *Escherichia coli* ATCC 11229

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Sesgo**

Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez

Muestra: Yodopovidona 10%

Código de muestra: MCY102022

Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC 11229

N° de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R- <i>l</i>	Cumple/ No cumple
1	46	43.0	4.3E+07	7.6335	0.07	CUMPLE
	40					
2	51	48.5	4.9E+07	7.6857	0.02	CUMPLE
	46					
3	52	49.5	5.0E+07	7.6946	0.01	CUMPLE
	47					
4	47	41.5	4.2E+07	7.6181	0.08	CUMPLE
	36					
5	39	36.5	3.7E+07	7.5623	0.14	CUMPLE
	34					
6	42	40.0	4.0E+07	7.6021	0.10	CUMPLE
	38					
Criterio	Concentración inoculada (I)			Log de I		
<0.3 log	5.0E+07			7.7011		

observaciones:

CONCLUSIONES

1. Los procedimientos descritos en la propuesta del protocolo de validación del método de efectividad antimicrobiana demuestran a través de evidencia objetiva documentada que el método es óptimo para analizar la calidad de los antisépticos como clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en el Laboratorio de Control de Calidad del MINSAL.
2. La metodología implementada para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% utilizando como referencia la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 publicada por el Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad de los Estados Unidos Mexicanos, evidencia un mayor porcentaje reducción cuando el tiempo de contacto de los microorganismos de prueba frente a los antisépticos es de 30 segundos con respecto a 5 segundos y 15 segundos.
3. El método propuesto a través del protocolo de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% cumple con los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y sesgo dados por la política de validación de métodos microbiológicos publicada por el OSA, cuando los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Y *Escherichia coli* ATCC 11229 se ponen a prueba frente a clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en un tiempo de contacto de 30 segundos.
4. Los resultados obtenidos en el informe de validación evidencian que el método planteado en el protocolo de validación no es óptimo para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en los tiempos de 5 y 15 segundos, debido al incumplimiento de los parámetros de desempeño en su totalidad frente a los microorganismos de prueba, exceptuando el tiempo de contacto de 30 segundos, donde se dictamina el cumplimiento de cada uno de los criterios.

Revisado por: _____ Firma: _____

Revisado por: _____ Firma: _____

Aprobación de Protocolo de Validación

Nombre: _____ Firma: _____

Nombre: _____ Firma: _____

**CAPITULO VI
CONCLUSIONES**

6.0 CONCLUSIONES

1. Los procedimientos descritos en la propuesta del protocolo de validación del método de efectividad antimicrobiana demuestran a través de evidencia objetiva documentada que el método es óptimo para analizar la calidad de los antisépticos como clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en el Laboratorio de Control de Calidad del MINSAL.
2. La metodología implementada para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% utilizando como referencia la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 publicada por el Sistema Integral de Normas y Evaluación de la Conformidad de los Estados Unidos Mexicanos, evidencia un mayor porcentaje reducción cuando el tiempo de contacto de los microorganismos de prueba frente a los antisépticos es de 30 segundos con respecto a 5 segundos y 15 segundos.
3. El método propuesto a través del protocolo de validación para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% cumple con los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y sesgo dados por la política de validación de métodos microbiológicos publicada por el OSA, cuando los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Y *Escherichia coli* ATCC 11229 se ponen a prueba frente a clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en un tiempo de contacto de 30 segundos.

4. Los resultados obtenidos en el informe de validación evidencian que el método planteado en el protocolo de validación no es óptimo para comprobar efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10% en los tiempos de 5 y 15 segundos, debido al incumplimiento de los parámetros de desempeño en su totalidad frente a los microorganismos de prueba, exceptuando el tiempo de contacto de 30 segundos, donde se dictamina el cumplimiento de cada uno de los criterios.

**CAPITULO VII
RECOMENDACIONES**

7.0 RECOMENDACIONES

1. Neutralice la actividad antimicrobiana de las muestras de estudio con inactivantes químicos que contiene el caldo Dey-Engley en combinación con la dilución de la muestra recomendada por el fabricante y que debe ser solicitada por el área de análisis microbiológico de ser necesario, para así poder evaluar la efectividad antimicrobiana en un tiempo específico de acción.
2. Verifique la cuenta viable inicial de cada microorganismo de prueba para para obtener la concentración inicial de referencia, ya que la concentración inicial debe ser relacionada en cada uno de los ensayos de efectividad antimicrobiana para poder realizar cálculo del porcentaje de reducción de reducción, esta recomendación va dirigida a los analistas del análisis microbiológico del Laboratorio de Control de Calidad que llevaran a cabo la validación de la metodología.
3. Reevalúe los tiempos de contacto de 5 segundos y 15 segundos si los analistas de análisis microbiológico de Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud desean evidenciar el poder reductor de la muestra con respecto al tiempo, sin embargo, la recomendación es validar el método únicamente en un tiempo de acción del antiséptico de 30 segundos, ya que es el criterio que la normativa de referencia NMX-BB-040-SCFI-1999 establece para comprobar efectividad antimicrobiana.
4. Hacer una verificación de las características físicas de las muestras a evaluar, la viscosidad es una característica que pueden influir en la manipulación y en la obtención de resultados confiables, por lo tanto, el analista de análisis microbiológico del Laboratorio de Control de calidad deberá solicitar al fabricante, de ser necesario, el certificado de análisis del proveedor donde se encuentre descrita la dilución a la que se puede llevar a cabo el análisis.

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez-Saldaña L, Anduaga ES, editores. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES [Internet]. Vol. 15. Dermatología Peruana; 2005. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/BV/Revistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf
2. Martínez B M L, Domínguez F J. Guía de antisépticos y desinfectantes, Hospital Universitario de Ceuta. Instituto Nacional de Gestión Sanitaria. Junio de 2013. Disponible en: <http://www.ingesa.msssi.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/GuiaAntisepticosdesinfectantes.pdf>
3. Pujol M, Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2013;31(2):108-113. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es/revista/enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica/28-articulo-epidemiologia-general-infecciones-nosocomiales-sistemas-S0213005-X130000254>
4. Ramírez P, Viera V. Antisepsia cutánea antes de la cirugía. Med Intensiva. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.medin.2018.07.019>. 4
5. Loyola ÁSM. Cura de heridas quirúrgicas. [Facultad de Ciencias de la Salud]; Universidad Pública de Navarra; 2014. Disponible en: <http://academica.e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/11280/AguedaSanMartinLoyola.pdf?sequence=1>
6. Alfaro ER. Consideraciones Importantes en el uso de desinfectantes [Internet]. 2015. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/NotaTecnicaN025ConsideracionesImportantesenelUsode_Desinfectantes.pdf
7. Bilbao N. Antisépticos y desinfectantes. Farmacia Profesional [Internet]. 2009;23(4):37-9. Disponible en: <https://www.elsevier.es/en/revista-farmacia-profesional/3-articulo-antisepticos-desinfectantes-13139886>

8. Bosquet LG. Antisépticos y desinfectantes. *Offarm* [Internet]. 2001;20(2):55-64. Disponible en: [https:// www.elsevier.es/ esrevistaoffarm4articuloantisepticosdesinfectantes13780](https://www.elsevier.es/esrevistaoffarm4articuloantisepticosdesinfectantes13780)
9. Instituto Salvadoreño del Seguro Social, Sub Dirección de Salud, División Técnica Normativa, Normalización y Estandarización. Manual de procedimientos operativos para la prevención y manejo de infecciones nosocomiales en el ISSS. 2005. Disponible en: [https:// www.transparencia.gob.sv/ institutions/iss/documents/147332/download](https://www.transparencia.gob.sv/institutions/iss/documents/147332/download).
10. Dirección General de Normas/ Scretaria de Economía Estados Unidos Mexicanos. NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos Generales de Análisis-Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germinicidas. México. Disponible en: [https:// www.sinec.gob.mx/ SINEC/ Vista/ Normalizacion/ DetalleNMX.xhtml? pidn=bTJM Q2RHL1Zko UtVTWZU WUpv VGw vdz09](https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=bTJM%20Q2RHL1Zko%20UtVTWZU%20WUpv%20VGw%20vdz09)
11. Pasachova Garzón J, Ramírez Martínez S, Muñoz Molina L. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova* [Internet]. 2019 dic. [citado 2022 abril 05]; 17(32): 25-38. Disponible en: [http:// www.scielo.org.co/ scielo.php? script=sciarttext&pid=S179424702019000200025&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sciarttext&pid=S179424702019000200025&lng=en).
12. Manzo GSZ, Flores HA, Padilla MYS. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica* [Internet]. 2014;25(3):129-143. Disponible en: [https:// www.medigraphic.com/ cgi-bin/ new/ resumen.cgi? IDARTICULO=53414](https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53414).
13. Ángeles GR. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica de México* [Internet]. 2002;44(5):464-75. Disponible en: [http:// www.scielo.org.mx/ scielo.php? script=sci_arttext&pid=S003636342002000500011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342002000500011)

14. Hospital San Joan de Déu. E. coli [Internet]. Kidshealth.org. [citado 11 de abril de 2022]. Disponible en: [https:// kidshealth.org/ HospitalSant Joan deDeu/es/teens/e-coli.html](https://kidshealth.org/HospitalSantJoanDeDeu/es/teens/e-coli.html)
15. Organismo Salvadoreño de Acreditación. PO 9.4 Política para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos. El Salvador; 2014, Disponible en: <http://www.osa.gob.sv/descarga/po9.4politica-para-la-validacion-y-estimacion-de-la-incertidumbre-de-metodos-microbiologicos/>
16. Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos/ Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. 1ra ed. Española. España: Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores; 2016. Disponible en: <https://www.eurachem.org/>
17. Ministerio de Salud de El Salvador. Unidad de aseguramiento de la calidad/ Laboratorio de control de calidad. www.salud.gob.sv [Actualizada 27 de Julio de 2021; acceso el 26 de febrero de 2022] Disponible en: [https://www.salud.gob.sv/ unidad-deaseguramiento de la calidad laboratorio decontroldecalidad/](https://www.salud.gob.sv/unidad-deaseguramiento-de-la-calidad-laboratorio-decontroldecalidad/)

ANEXOS

ANEXO N°1

Materiales y equipos, Preparación de soluciones y Medios de cultivo.

(Fuente: Según procedimiento interno del Laboratorio)

1.0 Materiales y Equipos.

- Guantes estériles
- Gabacha estéril.
- Gorro
- Zapateras.
- Cabina de Bioseguridad
- Gasa estéril
- Alcohol al 70%

2.0 Solución salina estéril al 0.9% y Agua estéril

- Balanza analítica.
- Micro espátula.
- Matraz volumétrico de 1000 mL
- Potenciómetro
- Agua purificada.
- Cloruro de sodio
- Autoclave

2.1 Procedimiento para solución salina:

- Pesar en balanza analítica 9 g de cloruro de sodio.
- Transferir cantidad pesada a un matraz volumétrico de 1000 mL
- Disolver en 500 mL de agua purificada, ajustar a un pH de $7,2 \pm 0,2$, agregar agua destilada a volumen y mezclar.
- Dispensar en recipientes y esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min a 15 psi de presión.
- Dejar enfriar y almacenar a una temperatura de 2 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$

Procedimiento para agua estéril

- Medir con ayuda de una probeta 800 mL de agua destilada
- Llevarla a un frasco de 1000 mL y rotularlo debidamente

- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos
- Almacenarlo en refrigeración a una temperatura de 2 a 8 °C hasta su posterior uso.

Preparación de los medios de cultivo. Agar TSA y Caldo Dey-Engley

- Beaker de 500 mL.
- Micro espátula estéril.
- Balanza semi analítica.
- Agitador magnético.
- Erlenmeyer de un litro.
- Hot plate
- Autoclave.
- Hidróxido de sodio 1N
- Ácido clorhídrico 1N
- Potenciómetro

Procedimiento

- Pesar cantidad de medio de cultivo adecuada que desea preparar según indicaciones del fabricante.
- Adicionar gramos pesados de medio en un recipiente adecuado para su preparación.
- Verter volumen total de agua según cantidad que se requiere preparar.
Nota: realizar lavados con el mismo volumen de agua total para evitar pérdidas del medio sólido.
- Realizar agitación mecánica para facilitar la disolución del medio.
- Medir el valor de pH antes de calentar el medio, en caso de ser necesario ajustar añadiendo cantidad suficiente de NaOH 1 N o HCl 1 N según el rango de pH indicado por el fabricante.
- Realizar calentamiento para facilitar la disolución del medio.
- Tomar una pequeña muestra de medio preparado para posterior lectura de pH.

- Llevar el medio de cultivo preparado al autoclave para esterilizar completamente a una temperatura de 120°C por 15 min a 15 psi
- Enfriar luego de esterilizar y tomar el pH de la muestra para ver si cumple con las condiciones del medio.
- Almacenar medio a temperatura de 2 a 8°C para ser usado posteriormente en método de vertido en placa.

Preparación de la cepa.

- Pellet con el microorganismo de referencia.
- Hisopo.
- Placas con medio de cultivo TSA
- Descarte para riesgos biológicos.
- Incubadora.

Conservación del microorganismo de prueba

- | | |
|--------------------------------------|------------------------|
| - Hisopos estériles. | - Beaker de 100 mL. |
| - Placas con agar TSA | - Glicerina esteril. |
| - Tubos con caldo CASOY de 45mL | - Rotulador. |
| - Micropipeta. | - Críoviales. |
| - Puntas estériles para micropipeta. | - Rack para crioviales |
| - Perlas de ebullición. | - Ultracongelador |
| | - Vortex. |

Preparación de la Suspensión Madre de los Microorganismos de Prueba.

- | | |
|---|-------------------------|
| - Criovial con el microorganismo de referencia. | - Incubadora. |
| - Hisopos estériles. | - Tubos con caldo CASOY |
| - Placas con agar TSA. | - Micropipeta. |
| | - Puntas estériles |
| | - Perlas de ebullición. |

- Beaker de 100 ml estéril.
- Espectrofotómetro UV visible
- Celdas para espectrofotómetro
- Tubos con solución buffer diluida
- Vortex

Determinación de la cuenta viable inicial de la suspensión, estandarizada entre 3% y 5% de transmitancia.

- Tubos con solución amortiguadora diluida con 9.9 mL.
- Micropipeta.
- Cajas petri.
- Puntas estériles
- Erlenmeyer con agar TSA
- Cuenta colonias.
- puntas estériles.
- Vortex

Comprobación de la efectividad antimicrobiana de clorhexidina 4% y yodopovidona 10%

Determinación de células sobrevivientes.

- Matraces de 250 mL con tapón estériles
- Bureta estéril
- Pinzas de sostén.
- Base para pinzas
- Suspensión de microorganismos previamente estandarizados
- Muestras de clorhexidina y yodopovidona
- Micropipeta
- Puntas estériles
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Suspensión de microorganismos
- Tubos de ensayo
- Placas estériles
- Agar TSA con neutralizante micropipeta
- Puntas estériles

- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Suspensión de microorganismos
- Tubos de ensayo
- Placas estériles
- Agar TSA

ANEXO N°2

Etiqueta de Identificación de Muestras

<p>Unidad de Aseguramiento de la Calidad/ Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud de El Salvador. Área de Análisis Microbiológico.</p> <p>Nombre genérico: _____</p> <p>Código de muestra: _____</p> <p>Fecha de recepción: _____</p> <p>Fecha de vencimiento: _____</p> <p>Método empleado: _____</p> <p>Analista: _____</p> <p>“Etiqueta de Muestra”</p>
--

Figura N° 2. Etiqueta de Identificación de Muestras.

(Fuente: Elaboración propia)

ANEXO N°3

Proceso para reanimación de cepas ATCC.

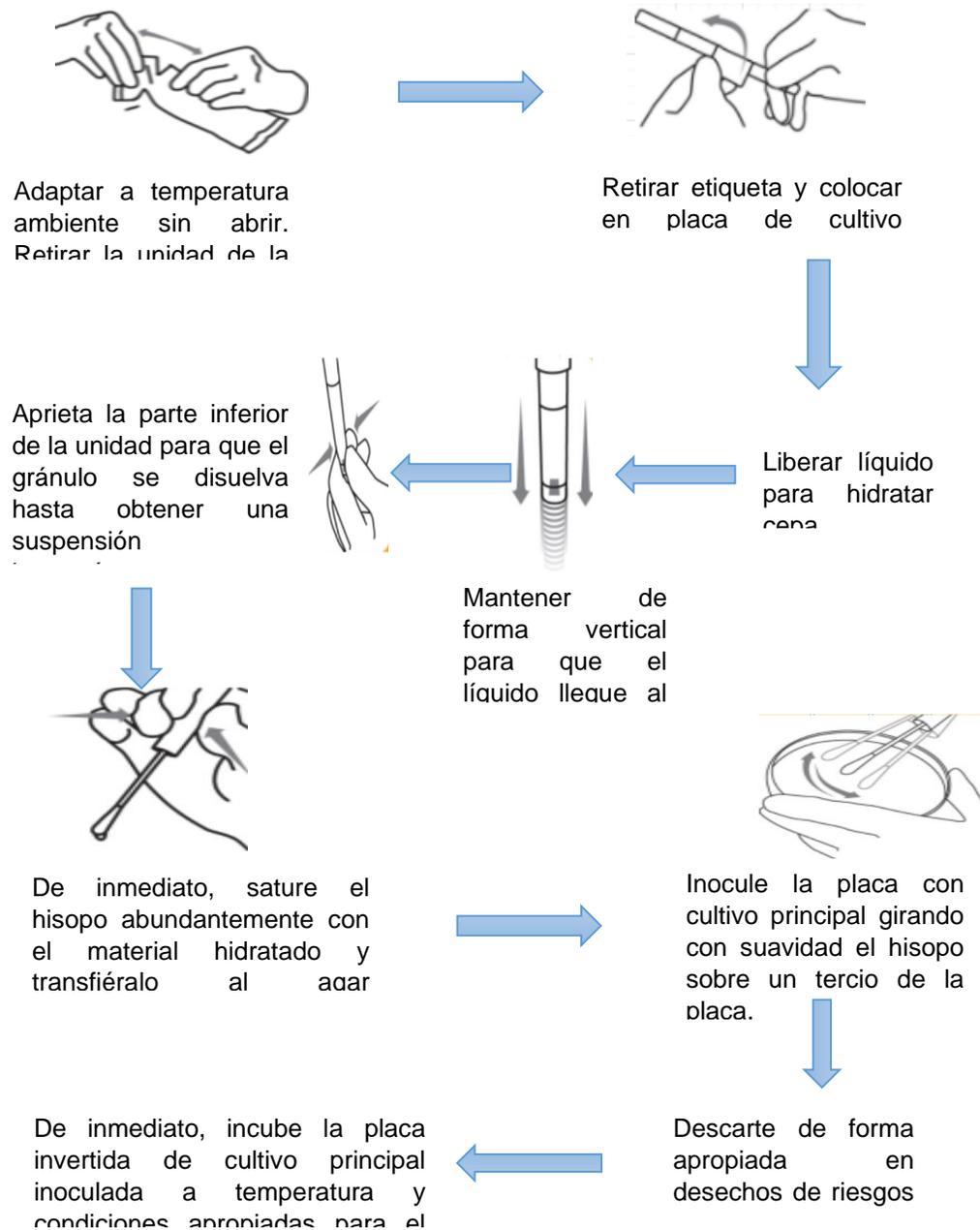


Figura N° 3. Proceso para reanimación de cepas ATCC.

(Fuente: Según procedimiento interno del Laboratorio.)

ANEXO N°4

Preparación de suspensión estandarizada.

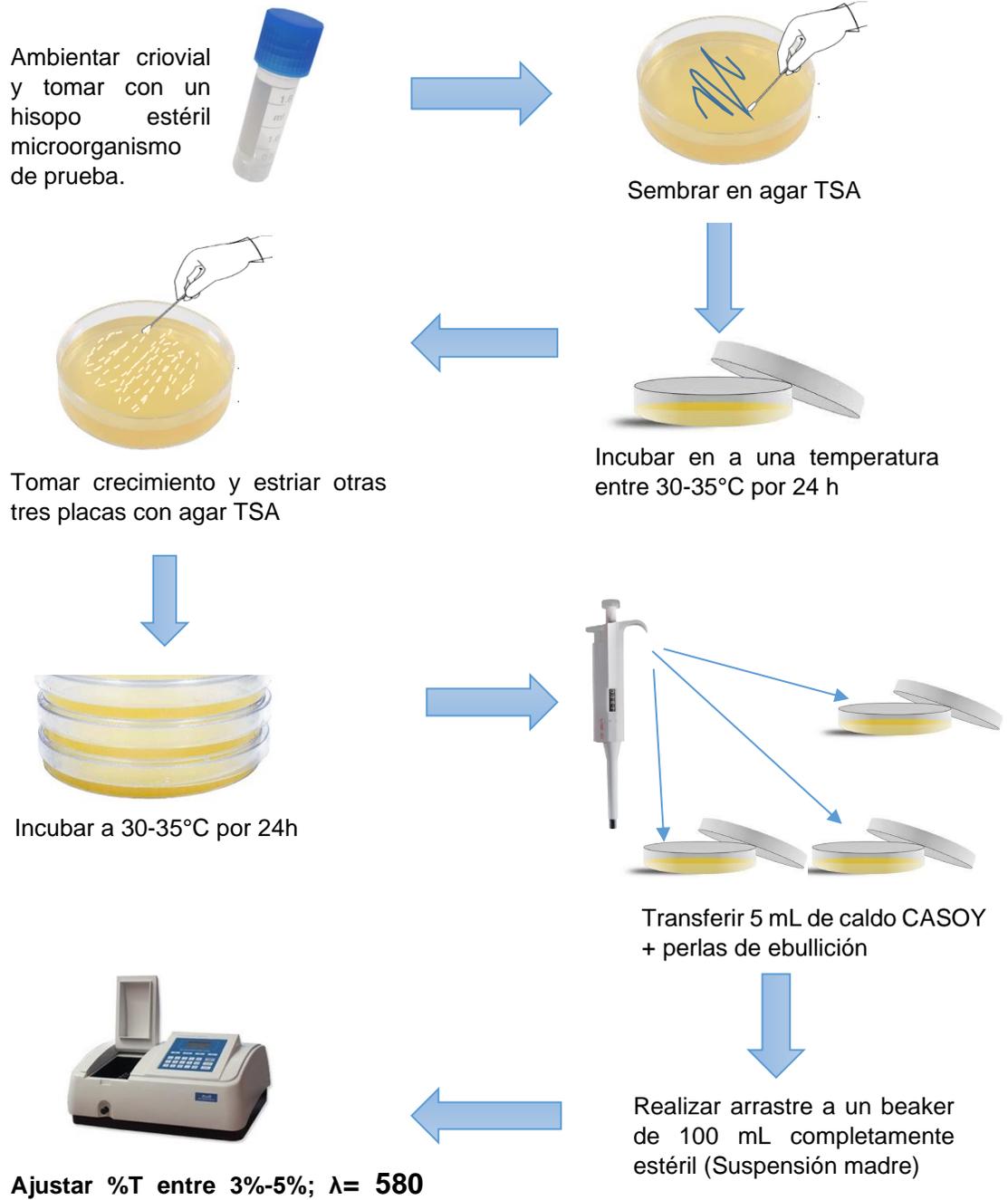


Figura N° 4. Preparación de suspensión estandarizada.

(Fuente: Según procedimiento interno del Laboratorio.)

ANEXO N°5

Verificación de Viabilidad de Microorganismos en la Suspensión Estandarizada entre 3% y 5% de Transmitancia.

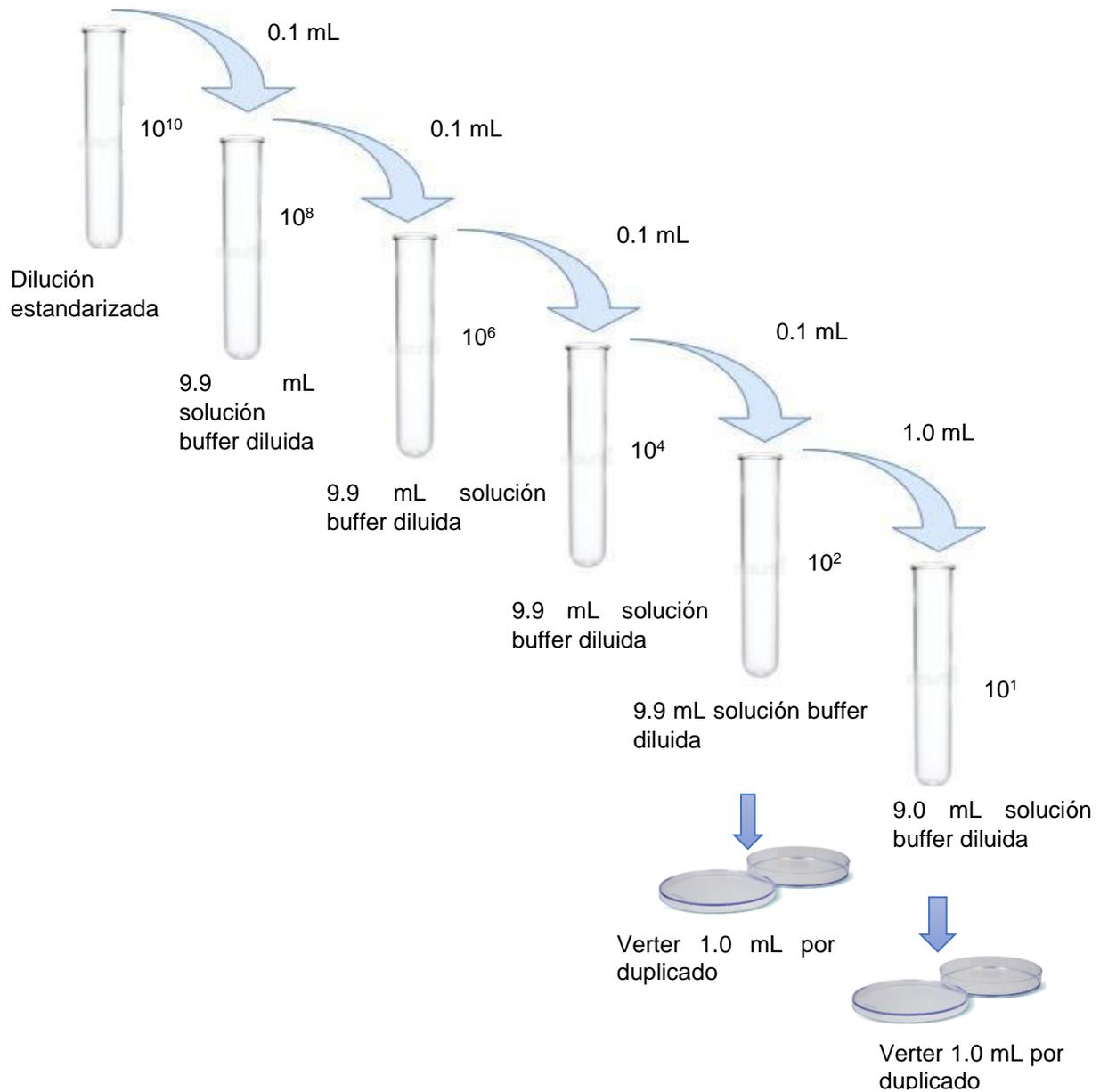


Figura N° 5. Verificación de Viabilidad de Microorganismos en la Suspensión Estandarizada entre 3% y 5% de Transmitancia. ((Fuente: Elaboración propia)

ANEXO N°6

Metodología para comprobar efectividad antimicrobiana en antisépticos.

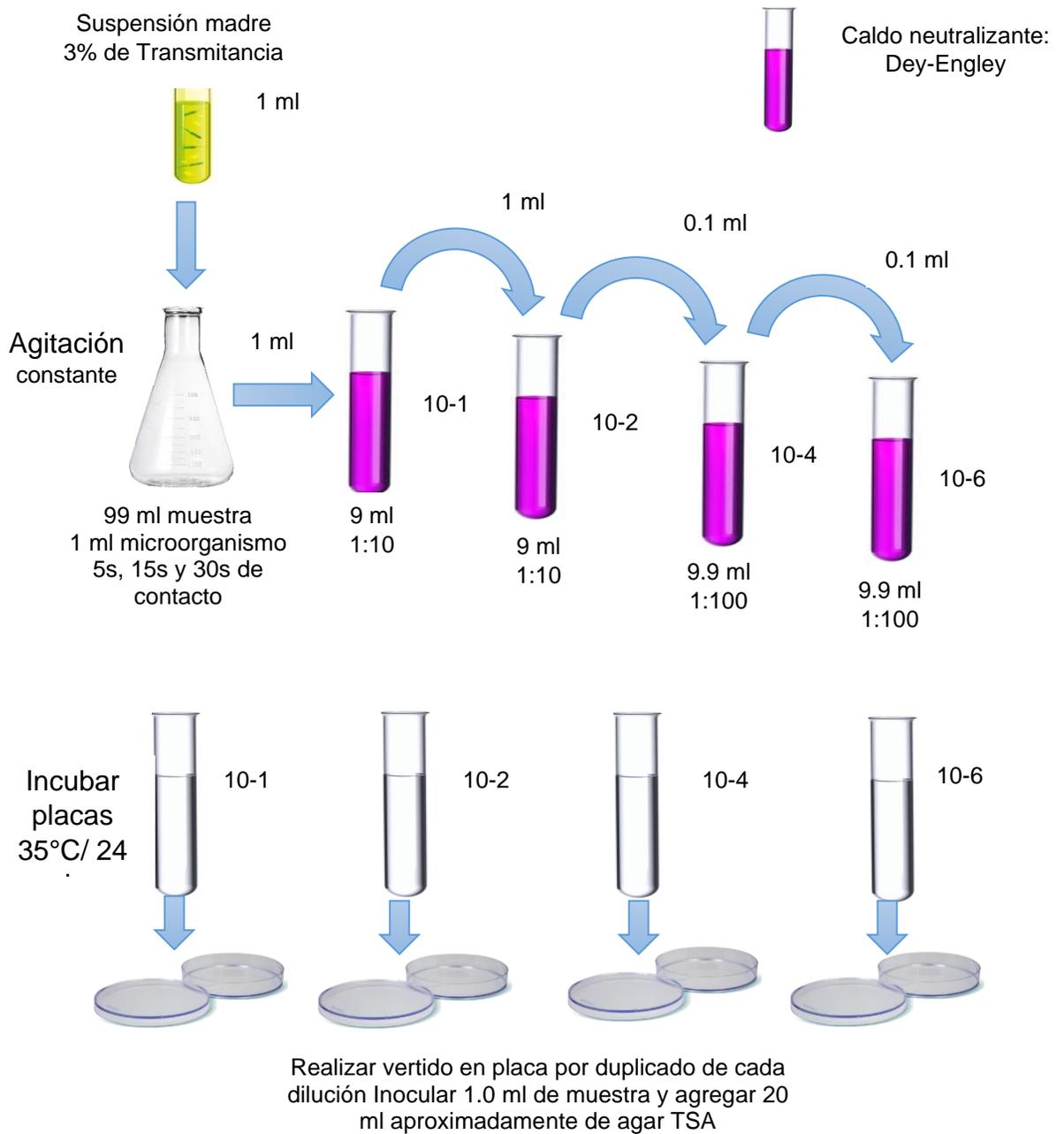


Figura N°6. Metodología para comprobar efectividad antimicrobiana en antisépticos.
(Fuente: Elaboración propia.)

ANEXO N°7

Diseño de protocolo de validación.

Logo	PROPUESTA DE PROTOCOLO DE VALIDACION PARA COMPROBAR LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CLORHEXIDINA 4% Y YODOPOVIDONA 10%.	Fecha: xx-xx-xx
	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD Área de Análisis Microbiológico	Página – de -

Objetivo		
Alcance		
Responsables		
Nombre	Cargo	Firma
	Analista	
	Analista	
Autorizado por:		
	Asesor	
	Asesor	

PARAMETROS EN ESTUDIO	
Repetibilidad	
Reproducibilidad	

Recuperación		
Sesgo		
Equipos		Materiales
Medios de Cultivo		
PROCEDIMIENTOS		
9. Identificación de la muestra		
10. Preparación de Soluciones		

10.1. Preparación de caldo neutralizante (Dey Engley)
10.2. Preparación de agar tripticasa soja (TSA)
10.3. Preparación de caldo digerido de caseína y soja (Caldo Casoy)
11. Identificación de los microorganismos de referencia
12. Preparación y acondicionamiento de las cepas ATCC
PROCEDIMIENTO DE VALIDACION DE EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA
13. Preparación de la suspensión madre y estandarización de los microorganismos
14. Determinación de la cuenta viable (CV) de los microorganismos
15. Dilución de muestra a 1:10 de clorhexidina 4% y Yodopovidona 10%

REPETIBILIDAD

REPRODUCIBILIDAD

RECUPERACION

SESGO

FORMULAS PARA DETERMINACIÓN DE PARAMETROS

Revisado por: _____ Firma: _____

Revisado por: _____ Firma: _____

Aprobación de Protocolo de Validación

Nombre: _____ Firma: _____

Nombre: _____ Firma: _____

ANEXO N°8

Diseño de informe de validación.

Logo	PROPUESTA DE INFORME DE VALIDACION PARA COMPROBAR LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CLORHEXIDINA 4% Y YODOPOVIDONA 10%.	Fecha: xx-xx-xx
	LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DEL MINISTERIO DE SALUD Área de Análisis Microbiológico	Página – de -

Objetivo		
Alcance		
Responsables		
Nombre	Cargo	Firma
Br. William Alexander Ramos Ramírez	Analista	
Br. Carlos Javier Juárez López	Analista	
Autorizado por:		
Lic. Edwin Eliú Alvanez Umaña	Asesor	
Lic. Julio Cesar Henríquez Pérez	Asesor	

MATERIALES Y EQUIPOS	
Equipos	Materiales
–	–
Medios de Cultivo	
–	

EFICACIA ANTIMICROBIANA

La siguiente tabla se utilizará para documentar los resultados de cada ensayo realizado en los diferentes parámetros.

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Determinación de Eficacia Antimicrobiana**

Datos

Analista: _____
Código de muestra: _____
Microorganismo: _____
Fecha de inicio: _____
Fecha de finalización: _____

Nº ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s

Observaciones:

RESULTADOS DE PARAMETROS DE VALIDACION

1. Determinación de la cuenta viable (CV) de los microorganismos

La siguiente tabla debe documentar los datos de transmitancia a la que se trabajó la suspensión de microorganismos y la determinación de la cuenta viable utilizada (CV).

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Estandarización de Cepas de Referencia					
Datos					
Analista: _____					
Microorganismo: _____					
Fecha de inicio: _____					
Fecha de finalización: _____					
Ensayo: _____					
N°	% de Transmitancia	Dilución	Recuento (UFC)	\bar{x} de recuento (UFC)	\bar{x} C.V. (UFC/mL)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
Observaciones:			Suma		
			Promedio		
			o		

REPETIBILIDAD

Se debe documentar los resultados obtenidos para el parámetro de repetibilidad y confirmar si cumple con el criterio de aceptación.

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Repetibilidad

Datos

Ensayo: _____

Código de muestra: _____

Microorganismo: _____

Fecha de inicio: _____

Fecha de finalización: _____

Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	Promedio				TOTAL					

Cálculo del % de Reproducibilidad

Tiempos	S1	DSR ₁ ²	% Reproducibilidad	Cumple
5s				
15s				
30s				

REPRODUCIBILIDAD

Se debe documentar los resultados obtenidos para el parámetro de reproducibilidad y confirmar si cumple con su criterio de aceptación.

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Reproducibilidad**

Datos

Ensayo: _____
 Código de muestra: _____
 Microorganismo: _____
 Fecha de inicio: _____
 Fecha de finalización: _____

Analista 1	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi-X)			(Xi-X) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	Promedio				TOTAL					
Analista 2	N° ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	Promedio				TOTAL					
Cálculo del % de Reproducibilidad										
Tiempo s	S1	S2	DSR ₁ ^2	DSR ₂ ^2	% Reproducibilidad	Cumple				
5s										
15s										
30s										

RECUPERACION

Se debe documentar los resultados obtenidos para el parámetro de recuperación y confirmar si cumple con su criterio de aceptación.

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Recuperación**

Datos

Analista: _____
 Muestra: _____
 Código de muestra: _____
 Microorganismo: _____
 Fecha de inicio: _____
 Fecha de finalización: _____

Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC/mL)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Log del recuento
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Cálculo del % de Recuperación

CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de Recuperación	Cumple/ No cumple
Criterio de aceptación		90-110%		

Observaciones

--

SESGO

Se debe documentar los resultados obtenidos para el parámetro de sesgo y confirmar si cumple con el criterio de aceptación.

**Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud
Área de Análisis Microbiológico
Parámetro de Sesgo**

Datos

Analista: _____

Muestra: _____

Código de muestra: _____

Microorganismo: _____

Fecha de inicio: _____

Fecha de finalización: _____

Nº de porciones	Recuento de lo recuperado (R)	\bar{X} de R	[R]	log [R]	/R-l/	Cumple/ No cumple
1	_____					

2	_____					

3	_____					

4	_____					

5	_____					

6	_____					

criterio	Concentración inoculada (l)			Log de l		
<0.3 log						

Observaciones:

CALCULOS PARA DETERMINACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE PARAMETROS

Se debe documentar y detallar todos los cálculos realizados de cada uno de los parámetros en estudio que fueron usados para poder determinar si cumplen con los criterios de aceptación previamente dados.

CONCLUSIONES

Las conclusiones deben detallar todos aquellos aspectos importantes que fueron considerados para la correcta realización del método de análisis para comprobar la efectividad antimicrobiana y poder cumplir con cada uno de los parámetros de validación

Revisado por: _____ Firma: _____

Revisado por: _____ Firma: _____

Aprobación de Protocolo de Validación

Nombre: _____ Firma: _____

Nombre: _____ Firma: _____

ANEXO N°9

Tabla N°25. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Efectividad Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: Carlos Javier Juárez López											
Código de muestra: MCL42022											
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10 ⁻⁶	24	13	0	21.5	11	1	-7	45	95
			19	9	2						
2	3%	10 ⁻⁶	16	8	0	21	10	0	-5	50	100
			26	12	0						
3	3%	10 ⁻⁶	24	9	0	23	10.5	0	-15	48	100
			22	12	0						
4	3%	10 ⁻⁶	22	11	0	20	12.5	0	0	38	100
			18	14	0						
5	3%	10 ⁻⁶	19	12	0	19.5	10	1	3	50	95
			20	8	2						
6	3%	10 ⁻⁶	20	7	0	16.5	7.5	0	18	63	100
			13	8	0						
Observaciones:											

ANEXO N°10

Tabla N°26. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
Datos											
Analista: William Alexander Ramos Ramírez											
Código de muestra: MCL42022											
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-6}	19	9	0	17	11	0	15	45	100
			15	13	0						
2	3%	10^{-6}	16	9	1	17	10	0.5	15	50	98
			18	11	0						
3	3%	10^{-6}	15	10	0	18.5	13	0.5	8	35	98
			22	16	1						
4	3%	10^{-6}	25	11	0	19.5	9	0	3	55	100
			14	7	0						
5	3%	10^{-6}	33	8	1	23.5	10	0.5	-17	50	98
			14	12	0						
6	3%	10^{-6}	24	10	0	19.5	8.5	0	3	58	100
			15	7	0						
Observaciones:											

ANEXO N°11

Tabla N°27. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC11229 por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: Carlos Javier Juárez López											
Código de muestra: MCL42022											
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-1}	13	0	0	10.5	0	0	100	100	100
			8	0	0						
2	3%	10^{-1}	34	1	0	30	0.5	0	100	100	100
			26	0	0						
3	3%	10^{-1}	18	0	0	21.5	0	0	100	100	100
			25	0	0						
4	3%	10^{-1}	58	2	0	49.5	1	0	100	100	100
			41	0	0						
5	3%	10^{-1}	8	0	0	8.5	0	0	100	100	100
			9	0	0						
6	3%	10^{-1}	15	0	0	16	0	0	100	100	100
			17	0	0						
Observaciones:											

ANEXO N°12

Tabla N°28. Cálculos del % de reducción de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC11229 por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: William Alexander Ramos Ramírez											
Código de muestra: MCL42022											
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-1}	13	0	0	35.5	0	0.5	29	100	99
			58	0	1						
2	3%	10^{-1}	11	0	0	8.5	0.5	0	83	99	100
			6	1	0						
3	3%	10^{-1}	1	0	1	0.5	0	0.5	99	100	99
			0	0	0						
4	3%	10^{-1}	2	0	0	1.5	0	0	97	100	100
			1	0	0						
5	3%	10^{-1}	13	0	0	16	0	0	68	100	100
			19	0	0						
6	3%	10^{-1}	21	0	0	16.5	0	0	67	100	100
			12	0	0						
Observaciones:											

ANEXO N°13

Tabla N°29. Cálculos del % de repetibilidad de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista: Carlos Javier Juárez López										
Código de muestra: MCL42022										
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-7	45	95	-6	-4	-3.33333	36	16	11.1
	2	-5	50	100	-4	1	1.66667	16	1	2.78
	3	-15	48	100	-14	-1	1.66667	196	1	2.78
	4	0	38	100	1	-11	1.66667	1	121	2.78
	5	3	50	95	4	1	-3.33333	16	1	11.1
	6	18	63	100	19	14	1.66667	361	196	2.78
	Promedio	-1	49	98.333333	TOTAL			626	336	33.3
Cálculo del % de Repetibilidad										
Tiempos	S1	DSR 1 ^{^2}			% Repetibilidad			Cumple/ No cumple		
5s	11.1892806	125.2			904.4187821			No cumple		
15s	8.19756061	0.027988338			13.52246808			No cumple		
30s	2.5819889	0.000689457			2.122369606			Cumple		

ANEXO N°14

Tabla N°30. Cálculos del % de repetibilidad de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC11229 por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista: William Alexander Ramos Ramírez										
Código de muestra: MCL42022										
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	5s	15s	30s	30s
William	1	29	100	99	- 44.833	0.16 7	- 0.6666 7	201 0	0.02 8	0.4 4
	2	83	99	100	9.1666 7	- 0.83	0.3333 3	84	0.69 4	0.1 1
	3	99	100	99	25.166 7	0.16 7	- 0.6666 7	633	0.02 8	0.4 4
	4	97	100	100	23.166 7	0.16 7	0.3333 3	537	0.02 8	0.1 1
	5	68	100	100	- 5.8333	0.16 7	0.3333 3	34	0.02 8	0.1 1
	6	67	100	100	- 6.8333	0.16 7	0.3333 3	46.7	0.02 8	0.1 1
	Promedio	73.833 3	99.8333 3	99.66666 7	TOTAL			334 5	0.83 3	1.3 3
Cálculo del % de Repetibilidad										
Tiempo s	S1	DSR 1 ^{^2}		% Repetibilidad		Cumple/ No cumple				
5s	25.864389 9	0.12271553		28.31503949		No cumple				
15s	0.4082482 9	1.67224E-05		0.330534055		CUMPLE				
30s	0.5163977 8	2.68453E-05		0.41879534		CUMPLE				

ANEXO N°15

Tabla N°31. Cálculo del % de reproducibilidad de clorhexidina 4% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
DATOS										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4% Código de muestra: MCL42022 Criterio de aceptación: $R < 3\%$ Código de muestra: MCL42022 Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 Analistas: Carlos Javier Juárez López William Alexander Ramos Ramírez										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos Juárez	1	-7	45	95	-6	-4	-3.3333	36	16	11.1
	2	-5	50	100	-4	1	1.6666	16	1	2.78
	3	-15	48	100	-14	-1	1.6666	196	1	2.78
	4	0	38	100	1	-11	1.6666	1	121	2.78
	5	3	50	95	4	1	-3.3333	16	1	11.1
	6	18	63	100	19	14	1.6666	361	196	2.78
	Promedio	-1	49	98.3333	TOTAL			626	336	33.3
Analista	N° ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William Ramos	1	15	45	100	10.5	-3.83	1	110	14.69	1
	2	15	50	98	10.5	1.167	-1	110	1.361	1
	3	8	35	98	3.5	-13.8	-1	12.3	191.4	1
	4	3	55	100	-1.5	6.167	1	2.25	38.03	1
	5	-17	50	98	-21.5	1.167	-1	462	1.361	1
	6	3	58	100	-1.5	9.167	1	2.25	84.03	1
	Promedio	4.5	48.8333	99	TOTAL			700	330.8	6

Cálculo del % de Reproducibilidad						
Tiempo s	S1	S2	DSR 1^{^2}	DSR 2^{^2}	% Reproducibilidad	Cumple
5s	11.1893	11.827 9	125.2	6.9086	929.0370252	No cumple
15s	8.19756	8.1342 9	0.02798	0.0277	19.08228419	No cumple
30s	2.581988 9	1.0954 5	0.00068 9	0.000122 4	2.303122037	Cumple

ANEXO N°16

Tabla N°32. Cálculo del % de reproducibilidad de clorhexidina 4% frente *Escherichia coli* ATCC11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
Datos										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de Clorhexidina 4% Parámetro de estudio: Reproducibilidad Código de muestra: MCL42022 Criterio de aceptación: $R < 3\%$ Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229 Analista 1: Carlos Javier Juárez López Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi-X)			(Xi-X) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos Juárez	1	100	100	100	2.8333 3	0	0	8.03	0	0
	2	100	100	100	2.8333 3	0	0	8.03	0	0
	3	100	100	100	2.8333 3	0	0	8.03	0	0
	4	100	100	100	2.8333 3	0	0	8.03	0	0
	5	83	100	100	- 14.167	0	0	201	0	0
	6	100	100	100	2.8333 3	0	0	8.03	0	0
	Promedio	97.166 7	100	100	TOTAL			241	0	0
Analista	N° ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William Ramos	1	29	100	99	- 44.833	0.16 7	- 0.6666 7	2010	0.028	0.44
	2	83	99	100	9.1666 7	- 0.83	0.3333 3	84	0.694	0.11
	3	99	100	99	25.166 7	0.16 7	- 0.6666 7	633	0.028	0.44
	4	97	100	100	23.166 7	0.16 7	0.3333 3	537	0.028	0.11
	5	68	100	100	- 5.8333	0.16 7	0.3333 3	34	0.028	0.11
	6	67	100	100	- 6.8333	0.16 7	0.3333 3	46.7	0.028	0.11

	Promedio	73.833 3	99.8333 3	99.6666 67	TOTAL	3345	0.833	1.33
Cálculo del % de Reproducibilidad								
Tiempo	S1	S2	DSR 1²	DSR 2²	% Reproducibilidad	Cumple/ No cumple		
5s	6.940220 94	25.864 4	0.00510 2	0.12271 55	28.89761829	NO CUMPLE		
15s	0	0.4082 5	0	1.672E- 05	0.330534055	CUMPLE		
30s	0	0.5164	0.00000 0	2.685E- 05	0.41879534	CUMPLE		

ANEXO N°17

Tabla N°33. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 bajo condiciones de prueba de clorhexidina 4% inactiva por analista1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
DATOS				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶ (UFC/mL)	Log del recuento
1	30	27	2.7E+07	7.431363764
	24			
2	18	22.5	2.3E+07	7.352182518
	27			
3	28	27	2.7E+07	7.431363764
	26			
4	28	24.5	2.5E+07	7.389166084
	21			
5	17	20	2.0E+07	7.301029996
	23			
6	27	31	3.1E+07	7.491361694
	35			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación n	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.30103	7.3994113	101.347499	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°18

Tabla N°34. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC11229 en presencia de clorhexidina 4% inactiva por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Log del recuento
1	32	30	3.0E+07	7.477121255
	28			
2	44	40.5	4.1E+07	7.607455023
	37			
3	36	32.5	3.3E+07	7.511883361
	29			
4	36	34.5	3.5E+07	7.537819095
	33			
5	42	40	4.0E+07	7.602059991
	38			
6	36	31	3.1E+07	7.491361694
	26			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.69897	7.53795007	97.9085523	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°19

Tabla N°35. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 bajo condiciones de prueba de clorhexidina 4% inactiva analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Datos				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC/mL)	Promedio de recuento	10^{-6}	Log del recuento
1	15	15	1.5E+07	7.176091259
	15			
2	14	19	1.9E+07	7.278753601
	24			
3	17	19	1.9E+07	7.278753601
	21			
4	19	20	2.0E+07	7.301029996
	21			
5	10	18	1.8E+07	7.255272505
	26			
6	17	13.5	1.4E+07	7.130333768
	10			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación n	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.30103	7.23670579	99.1189708	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°20

Tabla N°36. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC11229 en presencia de clorhexidina 4% inactiva por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MCL42022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC/mL)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Log del recuento
1	39	38.5	3.9E+07	7.58546073
	38			
2	44	40	4.0E+07	7.602059991
	36			
3	39	48	4.8E+07	7.681241237
	57			
4	49	44.5	4.5E+07	7.648360011
	40			
5	46	44	4.4E+07	7.643452676
	42			
6	49	44.5	4.5E+07	7.648360011
	40			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{x} del log de recuento	% de recuperación n	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.69897	7.63482244	99.1668033	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°21

Tabla N°37. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
Datos											
Analista: Carlos Javier Juárez López.											
Código de muestra: MCY102022											
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
1	3%	10 ⁻²	DNPC	762	0	DNPC	840	0	-	100	100
			DNPC	918	0						
2	3%	10 ⁻²	DNPC	42	0	DNPC	33	0	-	100	100
			DNPC	24	0						
3	3%	10 ⁻²	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
4	3%	10 ⁻²	DNPC	50	0	DNPC	45.5	0	-	100	100
			DNPC	41	0						
5	3%	10 ⁻²	DNPC	1	0	DNPC	3.5	0	-	100	100
			DNPC	6	0						
6	3%	10 ⁻²	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
Observaciones											

ANEXO N°22

Tabla N°38. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: William Alexander Ramos Ramírez											
Código de muestra: MY102022											
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
2	3%	10^{-2}	DNPC	249	0	DNPC	228	0	-	100	100
			DNPC	207	0						
3	3%	10^{-2}	DNPC	29	0	DNPC	32	0	-	100	100
			DNPC	35	0						
4	3%	10^{-2}	DNPC	57	0	DNPC	53.5	0	-	100	100
			DNPC	50	0						
5	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
6	3%	10^{-2}	DNPC	0	0	DNPC	0	0	-	100	100
			DNPC	0	0						
Observaciones:											

ANEXO N°23

Tabla N°39. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC11229 analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: Carlos Javier Juárez López											
Código de muestra: MY102022											
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-6}	48	35	0	50.5	33.5	0.5	-1	33	99
			53	32	1						
2	3%	10^{-6}	34	17	0	30	14	0.5	40	72	99
			26	11	1						
3	3%	10^{-6}	17	4	0	13.5	4	0.5	73	92	99
			10	4	1						
4	3%	10^{-6}	42	13	0	39.5	13.5	0	21	73	100
			37	14	0						
5	3%	10^{-6}	33	11	0	33	9	0	34	82	100
			33	7	0						
6	3%	10^{-6}	15	0	0	16	0	0	68	100	100
			17	0	0						
Observaciones:											

ANEXO N°24

Tabla N°40. Cálculos del % de reducción de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC11229 analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Determinación de Eficacia Antimicrobiana											
DATOS											
Analista: William Alexander Ramos Ramírez											
Código de muestra: MY102022											
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229											
N° ensayos	% T	Dilución	S (UFC)			\bar{X} de S (UFC)			% Reducción		
			5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15 s	30s
1	3%	10^{-6}	63	19	0	61	20	0.5	-22	60	99
			59	21	1						
2	3%	10^{-6}	23	17	3	20.5	16	1.5	59	68	97
			18	15	0						
3	3%	10^{-6}	17	15	2	18.5	10.5	1	63	79	98
			20	6	0						
4	3%	10^{-6}	34	0	0	37.5	0	0	25	100	100
			41	0	0						
5	3%	10^{-6}	13	0	0	16	0	0	68	100	100
			19	0	0						
6	3%	10^{-6}	21	0	0	16.5	0	0	67	100	100
			12	0	0						
Observaciones:											

ANEXO N°25

Tabla N°41. Cálculos del % de repetibilidad de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC6538 analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Código de muestra: MCY102022										
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	Promedio	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Cálculo del % de Reproducibilidad										
Tiempos	S1	DSR 1 ²		% Reproducibilidad			Cumple/ No cumple			
5s	-	-		-			-			
15s	0	0		0			CUMPLE			
30s	0	0		0			CUMPLE			

ANEXO N°26

Tabla N°42. Cálculos del % de repetibilidad de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC11229 analista 1(Fuente: Elaboración propia).

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Repetibilidad										
DATOS										
Analista: Carlos Javier Juárez López										
Código de muestra: MY102022										
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-1	33	99	-40.167	-42.3	-0.5	1613	1792	0.25
	2	40	72	99	0.83333	-3.33	-0.5	0.69	11.11	0.25
	3	73	92	99	33.8333	16.67	-0.5	1145	277.8	0.25
	4	21	73	100	-18.167	-2.33	0.5	330	5.444	0.25
	5	34	82	100	-5.1667	6.667	0.5	26.7	44.44	0.25
	6	68	100	100	28.8333	24.67	0.5	831	608.4	0.25
	Promedio	39.1667	75.33333	99.5	TOTAL			3947	2739	1.5
Cálculo del % de Reproducibilidad										
Tiempo s	S1	DSR 1 ²		% Reproducibilidad			Cumple/ No cumple			
5s	28.0956699	0.514571299		57.98159899			No cumple			
15s	23.4065518	0.096538492		25.11410252			No cumple			
30s	0.54772256	3.03023E-05		0.44494359			CUMPLE			

ANEXO N°27

Tabla N°43. Cálculos del % de reproducibilidad de yodopovidona 10% frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
DATOS										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10%										
Parámetro de estudio: Reproducibilidad										
Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%										
Código de muestra: MY102022										
Criterio de aceptación: $R < 3\%$										
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538										
Analista 1: Carlos Javier Juárez López										
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	Promedio	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Analista	N° ensayo	5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
William	1	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	2	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	3	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	4	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	5	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	6	-	100	100	-	0	0	-	0	0
	Promedio	-	100	100	TOTAL			-	0	0
Cálculo del % de Reproducibilidad										
Tiempos	S1	S2	DSR 1^2	DSR 2^2	% Reproducibilidad		Cumple/ No cumple			
5s	-	-	-	-	-		-			
15s	0	0	0	0	0		Cumple			
30s	0	0	0.000000	0	0		Cumple			

ANEXO N°28

Tabla N°44. Cálculos del % de reproducibilidad de yodopovidona 10% frente *Escherichia coli* ATCC11229. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Reproducibilidad										
DATOS										
Ensayo: Comprobación de efectividad Antimicrobiana de yodopovidona 10%										
Parámetro de estudio: Reproducibilidad										
Nombre genérico de muestra: Yodopovidona 10%										
Código de muestra: MY102022										
Criterio de aceptación: $R < 3\%$										
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC11229										
Analista 1: Carlos Javier Juárez López										
Analista 2: William Alexander Ramos Ramírez										
Analista	N° ensayo	% de reducción (Xi)			(Xi- \bar{X})			(Xi- \bar{X}) ²		
		5s	15s	30s	5s	15s	30s	5s	15s	30s
Carlos	1	-1	33	99	-40.167	-42.3	-0.5	1613	1792	0.25
	2	40	72	99	0.83333	-3.33	-0.5	0.69	11.1	0.25
	3	73	92	99	33.8333	16.67	-0.5	1145	277.8	0.25
	4	21	73	100	-18.167	-2.33	0.5	330	5.44	0.25
	5	34	82	100	-5.1667	6.667	0.5	26.7	44.4	0.25
	6	68	100	100	28.8333	24.67	0.5	831	608.4	0.25
	Promedio	39.1667	75.33333	99.5	TOTAL			3947	2739	1.5
William	1	-22	60	99	-65.333	-24.5	0	4268	600.3	0
	2	59	68	97	15.6667	-16.5	-2	245	272.3	4
	3	63	79	98	19.6667	-5.5	-1	387	30.25	1
	4	25	100	100	-18.333	15.5	1	336	240.3	1
	5	68	100	100	24.6667	15.5	1	608	240.3	1
	6	67	100	100	23.6667	15.5	1	560	240.3	1
	Promedio	43.3333	84.5	99	TOTAL			6405	1624	8

Cálculo del % de Reproducibilidad						
Tiempo	S1	S2	DSR 1^{^2}	DSR 2^{^2}	% Reproducibilidad	Cumple/ No cumple
5s	28.095669 9	35.792	0.51457 1	0.682224 9	88.42549513	NO CUMPLE
15s	23.406551 8	18.019 4	0.09653 8	0.045474 6	30.46011907	NO CUMPLE
30s	0.5477225 6	1.2649 1	0.00003 0	0.000163 2	1.124514399	CUMPLE

ANEXO N°29

Tabla N°45. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10^{-6}	Log del recuento
1	22 19	20.5	2.1E+07	7.311753861
2	15 19	17	1.7E+07	7.230448921
3	20 16	18	1.8E+07	7.255272505
4	21 20	20.5	2.1E+07	7.311753861
5	23 18	20.5	2.1E+07	7.311753861
6	26 19	22.5	2.3E+07	7.352182518
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{x} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.301029996	7.295527588	99.92463519	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°30

Tabla N°46. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 11229 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 1. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: Carlos Javier Juárez López				
Muestra: Yodopovidona 10%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Log del recuento
1	44	43	4.3E+07	7.633468456
	42			
2	46	38.5	3.9E+07	7.58546073
	31			
3	39	41.5	4.2E+07	7.618048097
	44			
4	48	41.5	4.2E+07	7.618048097
	35			
5	31	35.5	3.6E+07	7.550228353
	40			
6	46	45	4.5E+07	7.653212514
	44			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.698970004	7.609744374	98.84107056	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°31

Tabla N°47. Cálculo del % de recuperación de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Datos				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Clorhexidina 4%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Loga del recuento
1	15	18.5	1.9E+07	7.267171728
	22			
2	14	13.5	1.4E+07	7.130333768
	13			
3	18	17.5	1.8E+07	7.243038049
	17			
4	15	17	1.7E+07	7.230448921
	19			
5	17	19	1.9E+07	7.278753601
	21			
6	11	13	1.3E+07	7.113943352
	15			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación n	Cumple/ No cumple
2.0E+07	7.301029996	7.210614903	98.76161182	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones:				

ANEXO N°32

Tabla N°48. Cálculo del % de recuperación de *Escherichia coli* ATCC 11229 en presencia de yodopovidona 10% inactiva por analista 2. (Fuente: Elaboración propia)

Laboratorio de Control de Calidad del Ministerio de Salud Área de Análisis Microbiológico Parámetro de Recuperación				
Analista: William Alexander Ramos Ramírez.				
Muestra: Yodopovidona 10%				
Código de muestra: MY102022				
Microorganismo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229				
Porciones de muestra	Recuento de recuperación (UFC)	Promedio de recuento	10 ⁻⁶	Log del recuento
1	41	44	4.4E+07	7.643452676
	47			
2	45	41	4.1E+07	7.612783857
	37			
3	45	44.5	4.5E+07	7.648360011
	44			
4	43	44.5	4.5E+07	7.648360011
	46			
5	47	45	4.5E+07	7.653212514
	43			
6	39	40	4.0E+07	7.602059991
	41			
Cálculo del % de Recuperación				
CV (UFC/mL)	Log de CV	\bar{X} del log de recuento	% de recuperación	Cumple/ No cumple
5.0E+07	7.698970004	7.634704843	99.16527586	CUMPLE
Criterio de aceptación		90-110%		
Observaciones				

ANEXO N°33

Normativa Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999



MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS

GENERAL METHODS FOR ANALYSIS - ANTIMICROBIAL ACTIVITY DETERMINATION TO GERMICIDAL PRODUCTS

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

1.1 Objetivo

Esta norma mexicana establece el método de prueba para determinar la actividad antimicrobiana.

1.2 Campo de aplicación

Esta norma mexicana es aplicable a los productos germicidas, siempre y cuando la norma específica del producto así lo indique.

8 APARATOS

- Espectrofotómetro de luz visible y
- El usual de laboratorio de microbiología.

NOTA- El material de vidrio utilizado debe ser vidrio borosilicato de bajo coeficiente de expansión térmica, el que entre en contacto con la muestra, debe ser estéril.

9 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

9.1 Conservación de los microorganismos de prueba

Conservar las cepas de microorganismos resemebrándolas semanalmente en tubos con medio de cultivo inclinado (7 mL de agar nutritivo), de 16 mm x 125 mm, incubados de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C) y mantenerlos posteriormente en refrigeración.

9.2 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba

Antes de realizar la prueba, efectuar dos resiembras de cada uno de los microorganismos de prueba e incubar de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C).

A partir de estos cultivos, resemebrar cada uno de los microorganismos de prueba, en tubos de 22 mm x 175 mm que contengan cada uno 12 mL de agar nutritivo inclinado e incubar en las condiciones señaladas.

Remover el crecimiento de cada tubo, con 3 mL de solución salina, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm, dé una lectura entre 3 % y 5 % de transmitancia.

Determinar en la suspensión el número de UFC / mL y precisar el por ciento de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125 X 10⁸ UFC / mL. Lo anterior se verifica de acuerdo a lo indicado en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1 (ver 2 Referencias) y considerar estos valores para análisis futuros.

9.3 Determinación de la cuenta viable inicial

A un matraz Erlenmeyer que contenga 99 mL de la solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una entre 25 y 250 colonias.

Colocar en cajas de petri estériles, por duplicado 1 mL de cada dilución, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL de agar para métodos estándar, homogeneizar y dejar solidificar invertir las cajas de petri e incubar durante 48 h a 303 K - 308 K (30°C - 35°C). Contar las colonias contenidas en cada una de las cajas, en un cuenta colonias.

10 PROCEDIMIENTO

10.1 Determinación de las células sobrevivientes

10.2 Preparación de la muestra

Si es necesario, efectuar la dilución pertinente con agua para llevar el producto a la concentración de uso indicada por el fabricante en la etiqueta del envase.

10.3 Inoculación de la muestra

Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir exactamente y por duplicado 99 mL del producto o su dilución, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca estériles.

Agitar los matraces, suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que en el momento de la misma, aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo. Inocular en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.

Agitar el matraz con la muestra inoculada y exactamente 30 s después de la inoculación, transferir 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida o del caldo neutralizante, mezclar y transferir por duplicado alícuotas de 1.0 mL a cajas de petri estériles y continuar diluyendo hasta tener las diluciones necesarias para obtener placas que contengan de 25 a 250 colonias, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL del medio agar para métodos estándar con neutralizante, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 48 h entre 308 K a 310 K (35°C a 37°C). Después del período de incubación, contar el número de UFC en las placas.

11 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

11.1 Determinación del % de reducción

Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula:



NMX-BB-040-SCFI-1999
8/9

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

donde:

S son las células sobrevivientes UFC / mL, y
C.V. es la cuenta viable inicial.

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto.

11.2 Interpretación de resultados

Un producto etiquetado como germicida, debe tener un por ciento de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 30 s de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125×10^8 UFC / mL.

ANEXO N°34

PO 9.4 Política para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos.

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD
PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE
DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS
VERSIÓN 1 REVISIÓN 0
APROBADO 12/11/14



1. Introducción.

El análisis microbiológico tiene importancia en distintos campos de actividades tales como salud pública, tecnología de alimentos y medio ambiente. En El Salvador los laboratorios encargados de llevar a cabo la evaluación microbiológica trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, tanto legal como social, que reclama un alto nivel de calidad y de confianza. Por ello, tanto los métodos de ensayo como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar, la veracidad de los resultados.

Esto implica que, además de cumplir los criterios técnicos que aseguren su validez, deben ser realizados con una serie de garantías, que permitan obtener resultados comparables, independientemente del laboratorio que los ejecute, esto incluye pero no se limita a:

- Mediciones analíticas que satisfagan requerimientos acordados.
- Métodos y equipos que hayan sido probados para asegurar que son aptos para el propósito o fin previsto.
- Personal responsable de las mediciones que demuestre ser competente y calificado.
- Participación en programas de verificación externa de la competencia para asegurar que las mediciones analíticas realizadas en el laboratorio son consistentes a las que se realizan en otro lugar.
- Disposición de procedimientos bien definidos para el control y aseguramiento de la calidad y el uso de la información de control de calidad generada.

Dado que la validación de métodos es un requisito establecido en la norma ISO/IEC 17025:2005 se requiere de homologar los conceptos a forma de que se establezcan criterios de trabajo en el campo de la validación de métodos microbiológicos que puedan ser usados por los laboratorios acreditados o que soliciten la acreditación, así como por los evaluadores de acuerdo a los lineamientos de la ISO IEC 17025:2005 y las políticas de OSA. Esta guía constituye el primer trabajo en este sentido y pretende abrir el camino a la emisión de otros documentos que orienten los esfuerzos para demostrar competencia en este campo de aplicación.

2. Objeto y Campo de Aplicación

Establecer los criterios y lineamientos para la validación de métodos aplicados en laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.

Nota 1. Este documento no constituye una metodología para la validación de métodos de ensayo microbiológicos. Se indican lineamientos que faciliten tanto la implantación de los aspectos aquí recopilados, como su evaluación por parte de los miembros del equipo evaluador del OSA.

8.2.4 Otros métodos (Tipo IV)

La norma ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados y los métodos que diseña o desarrolla para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. Por tanto, para este tipo de métodos, el laboratorio deberá evaluar su idoneidad para su ámbito de aplicación así como las actividades necesarias a realizar para garantizar su validez técnica. En este sentido las actividades en los apartados 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3 de este documento, se han considerado como válidas para asegurar la adecuación al uso, pero no permiten garantizar de forma completa la validez de los métodos definidos como Tipo IV ni su caracterización ya que éstas deben estar fundamentadas en referencias válidas (ej.: ISO 16140, ISO /TR 13843, UNE-EN ISO 1799). Por lo tanto el Laboratorio deberá disponer de evidencias completas de que los métodos han sido validados de forma adecuada.

8.3 Procedimiento de validación

Se presentan a continuación características de funcionamiento que al menos se deben confirmar en el caso de métodos de referencia, alternativos y basados en métodos de referencia teniendo en cuenta la naturaleza del método:

8.3.1 Métodos Cuantitativos

Tener en cuenta que para cada uno de los parámetros acá definidos y sus respectivas especificaciones, prevalece lo establecido en los métodos de referencia utilizados para cada uno de los métodos.

Parámetro		
Repetibilidad	Muestras no contaminadas	Muestras contaminadas naturalmente
	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación del método. Límite de repetibilidad $r < 3\%$ $r = 2.8 + \sqrt{\frac{DSR^2}{n}}$ $r\% = r + 100$	Analista: uno Número mínimo de ensayos: seis Nivel de fortificación: no aplica. $r < 3\%$

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

PO 9.4 POLÍTICA PARA LA VALIDACIÓN Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

VERSIÓN 1 REVISIÓN 0

APROBADO 12/11/14

	$DSR = \frac{S}{\bar{X}}$	
Reproducibilidad	<p>Número de repeticiones: no menos de seis por analista. Mínimo 2 analistas. Nivel de fortificación: al menos uno de acuerdo a la especificación. $R < 3\%$</p> $R = 2.8 + \sqrt{\frac{DSR_1^2 + DSR_2^2}{n}}$ <p>$R\% = R \cdot 100$</p>	<p>Numero de repeticiones: no menos de seis por analista. Nivel de fortificación: no aplica $R < 3\%$</p>
Recuperación	<p>Número de repeticiones: al menos 6 porciones de muestra por cada analista. Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas. El nivel de fortificación al menos uno y se espera una recuperación entre el 90-110 % log. La verificación del inculo puede realizarse durante la ejecución del ensayo por sextuplicado. Nota/ en algunos casos puede requerirse más de un nivel de fortificación de acuerdo al rango de trabajo del método.</p> $\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Media del logaritmo del recuento} \cdot 100}{\text{Logaritmo de las UFC inoculadas}}$	
Sesgo	<p>Numero de repeticiones: por lo menos 6 Tipo de muestras: solo muestras no contaminadas. Número de analistas: uno Nivel de fortificación: por lo menos uno (medio) Cálculo: La diferencia absoluta de lo recuperado y lo inoculado es $< 0.3 \log$</p>	