

Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI




AOXLAB S.A.S

CONFIDENCIAL

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-025 Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2022-11-28
Revisó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2022-11-28
Aprobó:	Yasmín Eliana Lopera Pérez	Gerente		2022-11-28
Localización del documento:	http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/			

Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2017/08/10	1	Ninguno (versión original).	LVLS	YELP	YELP
Vigente	2022-11-28	2	Se cambia estilo según manual identidad.	APPP	DPP	YELP

ÍNDICE

Sección	Página
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	4
3. REFERENCIAS.	4
4. DESARROLLO.	4
4.1 Aparatos y equipos	4
4.2 Requisitos técnicos de funcionamiento	5
4.3 Condiciones ambientales requeridas	5
4.4 Identificación de la muestra	5
4.5 verificaciones generales.	5
4.6 Verificación del correcto funcionamiento de los equipos.	5
4.7 Preparación de soluciones	6
4.8 Preparación de la curva fenólica	6
4.9 Preparación del Inóculo (Cepa bacteriana de interés)	7
4.10 Preparación del Inóculo (Cepa bacteriana de interés)	7
4.11 Obtención del coeficiente Fenólico.	8
4.12 Factores a ser controlados	8
4.13 Registro de los datos del muestreo.	8
4.14 Método de registro (observaciones y resultados)	9
5. RESPONSABILIDADES.	9
5.1 Líder de calidad	9
5.2 Líder de laboratorio	9
5.3 Analistas	9
6. Formatos relacionados	9
7. Anexos	9

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de sustancias orgánicas e inorgánicas catalogadas como desinfectantes por el método de Coeficiente Fenólico.

1.2 ALCANCE: Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DESCRIPCIÓN DEL ITEM A ENSAYAR

2.1 Definiciones generales

La Concentración mínima inhibitoria (MIC)[1]: En microbiología, es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.

La Concentración Mínima Bactericida (CMB)[1]: es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Informe de resultados”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3.REFERENCIA

[1] NTC2455: Desinfectantes Limpiadores Líquidos. Desinfectantes Para Uso Doméstico.2000-10-25.

4.DESARROLLO

4.1. APARATOS Y EQUIPOS

Tubos de ensayo
Pipetas de 5 y 10 mL
Gradillas
Incubadora
Cámara o cabina de Siembra

Autoclave
Material de vidrio necesario
Mecheros de alcohol
Micropipetas

4.2 REQUISITOS TÉCNICOS DE FUNCIONAMIENTO:

- Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

4.3 CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS

Espacio: El aire suministrado al laboratorio debe ser de calidad adecuada y no debe representar una fuente de contaminación.

Humedad: La humedad relativa debe estar entre 50 y 60%.

Temperatura: Debe estar entre 15 y 25 grados centígrados. En climas de temperatura máxima superior a los 22 grados centígrados, es necesario equipo de aire acondicionado que garantice la estabilidad de la temperatura.


Iluminación: La intensidad mínima de iluminación del laboratorio deberá estar sobre 300 luxes.

4.4 Identificación de la muestra

La muestra recolectada debe ser identificada y rotulada según formato (FOR-TC-008).

4.5 Verificaciones generales:

- Stock de los reactivos y medios de cultivo a utilizar en el proceso, fichas de bioseguridad y matriz de compatibilidad.
- Fecha de vencimiento de los reactivos y medios de cultivo.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-025</p>
		<p>Revisión: 2</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2022-11-28</p>

- Cantidad necesaria por utilizar o preparar de reactivo o medio de cultivo dependiendo del número de muestras.
- Bitácora de uso de equipos y gasto de medios de cultivo.

4.6 Verificación del correcto funcionamiento de los equipos

Antes de cualquier uso de los equipos se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso y no requiere alguna intervención

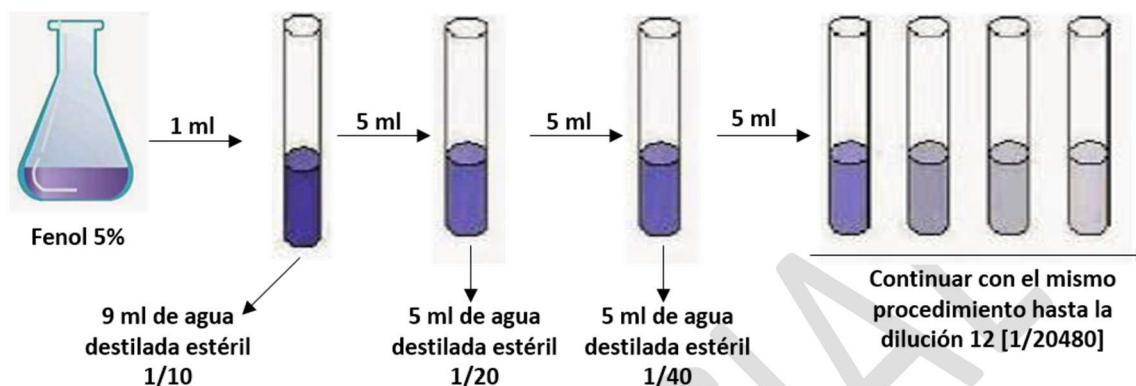
4.7 Preparación de soluciones

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Caldo BHI	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar por cada tubo de ensayo requerido 5 ml del medio.
Caldo Nutritivo	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar por cada tubo de ensayo requerido 5 ml del medio.
Reactivo Fenol 5%	50 g 5 g 2,5 g	1000 ml 100 ml 50ml	Preparar por cada tubo de ensayo requerido 5 ml del reactivo según la dilución.

4.8 Preparación de la curva fenólica.

1. Prepare las diferentes diluciones como se muestra en la gráfica 1.

DILUCIÓN	1 (1/10)	2 (1/20)	3 (1/40)	4 (1/80)	5 (1/160)	6 (1/320)	7 (1/640)	8 (1/1280)	9 (1/2560)	10 (1/5120)	11 (1/10240)	12 (1/20480)
[mg/L]	5000	2500	1250	625	312,5	156,25	78,125	39,0625	19,531	9,765	4,882	2,441



Gráfica 1: Esquema de diluciones seriadas para coeficiente fenólico.

4.9 Preparación del Inóculo (Cepa bacteriana de interés)

24 horas antes del ensayo inocule 100 ml de medio de cultivo estéril (caldo BHI ó caldo nutritivo) con 3 o 4 colonias del microorganismo a evaluar, incube a 37°C. Se requiere que la curva microbiana este en su fase exponencial para el desarrollo del procedimiento de CMI.


4.10 Preparación de la muestra.

- Para **muestras líquidas** prepare las mismas diluciones que se realizaron con el fenol al 5%.
- Para **muestras sólidas**:

Opción 1: Pese 1 gramo de la muestra y lleve a 10 ml de suspensión (dilución 1/10) (Para una muestra más representativa tome 10 gramos y lleve 100 ml) y continúe preparando las diluciones seriadas según el esquema anterior.

Opción 2: Prepare una suspensión madre según el % del componente activo de la muestra.

Ejemplo: Si el componente activo de la muestra es del 50% realice la suspensión en mg/L. y continúe preparando las diluciones seriadas según el esquema anterior.

	<p>Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-025</p>
		<p>Revisión: 2</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2022-11-28</p>

Una vez preparadas las diluciones se procede a la siembra de los tubos con el medio de cultivo estéril (Caldo BHI o Caldo Nutritivo).

1. Adicionar 0,5 ml (500µl) de cultivo test (cultivo en caldo de 22-26 horas e incubado a 37°C) a cada tubo de la dilución. Agitar y dejar en reposo.
2. 5 minutos después de la primera siembra, transferir 0,1 ml (100µl) de cada tubo y cada dilución al tubo respectivo con el medio de cultivo estéril previamente rotulado.
3. Repetir la operación anterior a los 10 y 15 minutos de estar en contacto el cultivo con el desinfectante.

De esta manera se cumplen los tiempos de 5, 10 y 15 minutos de contacto del cultivo con el desinfectante.

4. Incubar los tubos de subcultivos 24-48 horas a 37° C.
5. Pasado el tiempo de incubación leer los resultados, realizando una evaluación macroscópica de crecimiento en cada uno de los tubos.
 - Tubo con turbidez, se considera positivo.
 - Tubo sin turbidez, se considera negativo.


Incubación: Debe ser registrada en el formato FOR-GC-017

6. Esta operación se repite con la solución stock de fenol y con cada cepa patrón.
7. Obtener el valor de coeficiente de fenol.

4.11 Obtención del coeficiente Fenólico.

Interpretación: La mayor dilución del desinfectante que mate a los microorganismos en 10 minutos, pero no los mate en 5 minutos se divide por la dilución mayor de fenol que dé los mismos resultados.

$$* \text{ Coeficiente Fenólico (Relación Producto: Fenol) } = \frac{\text{CMI} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \text{ del Producto}}{\text{CMI} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \text{ del Fenol al 5\%}}$$

	<p>Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-025</p>
		<p>Revisión: 2</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2022-11-28</p>

**Los miligramos por litro (mg/L) del producto deben ser igual o menor a los mg/L del fenol al 5%-*

** EL índice de la relación Producto/Fenol debe ser ≤ 1*

Nota: el coeficiente fenólico es diferente para cada cepa de referencia.

4.12 Factores a ser controlados durante el muestreo.

El Laboratorio identifica los siguientes factores como sujetos a control durante el muestreo:

- Temperatura de muestreo
- Temperatura de transporte
- Homogenización de la muestra

4.13 Registro de los datos del muestreo.

El Laboratorio realiza el registro de los siguientes datos durante el muestreo:

- ❖ procedimiento de muestreo usado,
- ❖ personal que realiza el muestreo,
- ❖ condiciones ambientales de influencia (si es necesario),
- ❖ diagrama de la zona del muestreo
- ❖ Consecutivo de la muestra

4.14 Método de registro (observaciones y resultados)

Registro manual en cuaderno de laboratorio: todas las anotaciones derivadas del desarrollo del método incluyendo cálculos y/o procedimientos anexos a la preparación de muestras, preparación de medios de cultivo, diluciones y/u otros y los resultados en los correspondientes formatos FOR-TC-014 (Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos), FOR-TC-015 (Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación)

Copia de seguridad: se realizará copia automática de seguridad diariamente a las 21H en el servidor del laboratorio.


5. RESPONSABILIDADES.

5.1 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

5.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

	<p>Procedimiento para Determinar la concentración mínima inhibitoria CMI</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	Identificación: PROC-TC-025
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2022-11-28

5.3 Analistas.

Aplicar el presente documento.

6. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-014 (Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos)

FOR-TC-015 (Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación)

7. ANEXOS.

No aplica

CONFIDENCIAL