Facultad de Biología, Ciencias Ambientales y Química

Departamento de Química Analítica,

Química Física e Ingeniería Química

Validación de un método cualitativo de *screening* de muestras para el análisis microbiológico de cosméticos empleando citometría de flujo con detección fluorimétrica

Tesis Doctoral

Marta Plaza Gordito

Alcalá de Henares, Junio 2016

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Edificio Polivalente
Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
España

ALBERTO ESCARPA MIGUEL, Profesor Titular de Química Analítica del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO DE *SCREENING* DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA**", ha sido realizada bajo su dirección por Dña. Marta Plaza Gordito.

Asimismo, esta Tesis Doctoral reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 2 de Junio de 2016.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ · DEPARTAMENTO QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Edificio Polivalente
Carretera Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
España

ALBERTO ESCARPA MIGUEL, Profesor Titular de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO DE *SCREENING* DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO CON DETECCIÓN FLUORIMÉTRICA**", ha sido realizada por Dña. Marta Plaza Gordito bajo la dirección del Dr. Alberto Escarpa Miguel, Profesor Titular del departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá.

Asimismo, esta Tesis Doctoral reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente en Alcalá de Henares a 2 de Junio de 2016.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA

Llegado este momento, es inevitable agradecer a la gente y entidades que han estado acompañándome durante esta travesía, con las que he tenido la posibilidad de compartir y enriquecer mí día a día y sin las cuales este proyecto no podría haberse hecho realidad.

En primer lugar, agradecer a mi Director de Tesis Alberto Escarpa, por la profesionalidad y apoyo demostrado durante todos estos años. Por aceptar este reto, pues aunque era un proyecto distinto de lo habitual por proceder del ámbito empresarial y por ser una línea de investigación distinta a la suya, sin dudarlo, lo apoyó desde el primer momento. Gracias por haber conseguido transformar este proyecto en una realidad.

Agradecer a la compañía Antonio Puig S.A., de la cual tengo el orgullo de pertenecer desde el año 2003, por la oportunidad dada para llevar a cabo un proyecto de esta envergadura, demostrando una vez más, lo importante que son las personas para esta compañía. Gracias por el apoyo económico recibido para continuar formando y desarrollándome profesionalmente y por la cesión de equipos, muestras, fungibles e instalaciones, sin las cuales no hubiera sido posible realizar esta Tesis Doctoral.

No puedo olvidar a Inma, como parte integrante de Puig, a la que considero mi mentora dentro de la compañía, más que eso, mi amiga. Desde el principio depositó su confianza en mí y ha estado siempre a mi lado, compartiendo risas, alegrías, buenos y malos momentos. No sólo entendiendo el proyecto, sino lo que necesitaba día a día, motivándome y siendo una inspiración para mí.

Agradecer también a la compañía Chemunex, el apoyo técnico recibido por parte del equipo de personas que lo integran y en particular

a Lucie, por hacerme descubrir y entender el mundo de la citometría de flujo.

El transcurso de estos años no habría sido igual sin mis compañeros de doctorado, en especial Miriam, que desde que nos conocimos hemos vivido juntas esta experiencia. Sin su ayuda y amistad, esto no hubiera sido posible.

Como no, destacar fundamentalmente a los pilares de mi vida, mi familia, que tengo la suerte de tener a mi lado y con quienes tengo el privilegio de compartir ilusiones, alegrías, miedos y algún que otro momento no tan bueno, en definitiva… la vida. En primer lugar, a mis padres por ser siempre un ejemplo para mí y por tener su apoyo incondicional. Papá, gracias por esa portada ¡tan preciosa! Por ser inspiración en mi vida, aportarme visión y confianza para ser mejor persona. A mi madre, por ponerme los pies en la tierra y por estar incondicionalmente, esforzándose día a día para que pueda realizar mis sueños, sin descuidar a mi familia ni a mí misma en ningún momento, lo que me ha permitido compaginar la vida laboral, personal y estudiantil. Como no, a mi compañero del alma y vida, Alberto, que me comprende, apoya y sigue a mi lado pese a las dificultades que nos ha puesto la vida. Si es bonito pensar lo que hemos compartido en el pasado, imagínate lo que nos queda por compartir…Y por último a mi Luz, mi hijo Mario, nacido en el transcurso de este proyecto, que es la alegría de mi vida. Cómo una personita tan pequeña, puede ser tan grande.

Muchas gracias a todos.

“Para investigar la verdad es preciso dudar,

en cuanto sea posible, de todas las cosas”

René Descartes (1596 – 1650)

A mi familia

Los productos cosméticos en su uso habitual deben ser inocuos para los usuarios. En este sentido, en los geles de baño, uno de los productos cosméticos de mayor comercialización y aplicación, dicha inocuidad se asegura generalmente mediante un estricto control de la calidad microbiológica en el que han de cumplir con las especificaciones definidas en la Norma Internacional "Cosméticos. Microbiología. Límites microbiológicos (UNE-EN-ISO 17516:2014)": recuento de microorganismos aerobios viables totales <1000 u.f.c./g o mL de producto para cosméticos de uso general y <100 u.f.c./g o mL de producto para cosméticos aplicados en el contorno de los ojos y en los cosméticos destinados a bebés y ausencia por g o mL de producto de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* y *Candida albicans.*

En este ámbito legislativo, los métodos tradicionales empleados para el control microbiológico presentan una serie de desventajas muy importantes, como son la baja sensibilidad, los elevados tiempos de análisis y la elevada variabilidad de los resultados. Para paliar estas desventajas, han surgido como alternativa los denominados métodos microbiológicos rápidos dentro de los cuales cabe destacar la citometría de flujo con detección por fluorescencia. La citometría de flujo con detección por fluorescencia se basa en la detección de microorganismos previamente marcados o derivatizados, cuando estos fluyen en suspensión mediante el principio de enfoque hidrodinámico, a través de una célula de flujo en el detector de fluorescencia.

Sin embargo, la aplicación de estos métodos alternativos nuevos en general, y de la citometría de flujo con detección por fluorescencia en particular, precisa de estudios de validación analítica que permitan verificar y documentar la adecuación de unos requisitos previamente

establecidos (características analíticas o parámetros de calidad) para una determinada finalidad perseguida ("*fitness for purpose"*).

Dentro de este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la validación analítica de un método cualitativo rápido de cribado o de *screening* de muestras, para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de muestras cosméticas empleando citometría de flujo con detección por fluorescencia.

Para alcanzar este objetivo general, el Plan de Trabajo llevado a cabo ha quedado constituido por las siguientes etapas:

1- Identificación de los parámetros analíticos de calidad de los métodos cualitativos en el ámbito microbiológico.

2- Definición del uso previsto (*fitness for purpose*) para establecer las líneas de actuación y llevar a cabo la validación analítica de un método nuevo de citometría de flujo con detección por fluorescencia para el cribado microbiológico de muestras cosméticas.

3- Estudio del proceso de neutralización del conservante, como etapa metodológica previa y fundamental a cualquier análisis microbiológico en muestras cosméticas.

4- Evaluación de los parámetros de calidad del método propuesto, con el fin de conseguir la calidad microbiológica de las muestras cosméticas en términos de recuento de microorganismos aerobios totales y ausencia de patógenos no permitidos: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Candida albicans*.

5- Estudio de la correspondencia entre el método propuesto de citometría de flujo con detección por fluorescencia y el método tradicional de siembra en placa empleando muestras cosméticas comercializadas.

Los principales resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral pivotan alrededor de tres conjuntos de estudios realizados y perfectamente definidos: la neutralización del conservante cosmético, la evaluación analítica de los parámetros críticos de calidad y el análisis de los productos cosméticos acabados y aptos para su comercialización. Todo ello, ha permitido asegurar la validación analítica del método propuesto que se traduce en garantizar el uso previsto definido: *el cumplimiento de las especificaciones cosméticas y en la obtención de resultados de igual o mejor calidad en un tiempo menor que el establecido por el método tradicional.*

La neutralización del conservante cosmético como paso clave en el análisis de los productos cosméticos se ha llevado a cabo estudiándose la inoculación individual no sólo de cada cepa no permitida por la especificación indicada anteriormente (*P. aeruginosa, S. aureus, E. coli* y *C. albicans)* sino también de aquellas especificadas en la Farmacopea Europea (*Bacillus subtilis* y *Aspergillus brasiliensis*). En este tipo de estudios, se han encontrado unas condiciones óptimas de neutralización química y por dilución de los conservantes para todos los productos cosméticos estudiados correspondientes a 1:100 (p/p) durante un tiempo de actuación de 30 min.

Por su parte, la evaluación de los parámetros de calidad (falsos positivos, falsos negativos, fiabilidad, no fiabilidad, sensibilidad y especificidad) llevada a cabo tanto en los estudios de los blancos como en

los estudios de inoculación individual de las muestras de geles para todas las cepas prohibidas, ha permitido demostrar no sólo la pertinencia y viabilidad del criterio instrumental de clasificación de muestras cosméticas sino inclusive la simplificación del mismo. Asimismo, se ha demostrado que la capacidad de detección del método permite asegurar ausencia de patógenos prohibidos en todos los casos examinados excepto para la levadura *C. albicans*.

Por último, se ha demostrado que el método propuesto es válido para el análisis de todos los productos cosméticos acabados debido a que cumple con especificaciones (excepto para *C. albicans*) generando resultados de igual o superior calidad analítica a los obtenidos por el método tradicional (determinación de microorganismos viables pero no cultivables) y en un tiempo de análisis menor (disminución del 60 %), permitiendo por ello el aseguramiento de la calidad microbiológica de todos los productos cosméticos comerciales.

Por todo ello, y con la sola excepción de la detección de *C. albicans*, se puede concluir que se ha llevado a cabo con éxito la validación analítica de un método cualitativo rápido de cribado de muestras de geles, mediante citometría de flujo con detección por fluorescencia para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de los productos cosméticos comercializados por Antonio Puig S.A.

Cosmetic products in their regular use must be innocuous for the users. Shower gels -one of the cosmetic products of major commercialization and application- must be assured for its innocuousness by strict control of the microbiological quality as regulated by the International Norm "Cosmetics. Microbiology. Microbiological limits (UNE-EN-ISO 17516:2014)": aerobic viable total count of microorganisms <1000 c.f.u./g or mL of product for general use cosmetics and <100 c.f.u./g or mL of product for cosmetics applied in the eye contour and babies and absence per g or mL of product of *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* y *Candida albicans.*

Traditional methods used for microbiological control hold considerable disadvantages such as low sensitivity, high time consumption and extremely high variability. To overcome these disadvantages, microbiological rapid methods have arisen as alternative to those traditional ones. One of these methods is flow cytometry by fluorescence detection. This method is based on the detection of previously marked microorganisms when they flow in suspension by hydrodynamic focusing principle across a flow cell with fluorescence detector.

Nevertheless, the application of these alternative new methods in general, and flow cytometry in particular, requires of analytical validation in order to ensure the fitness for purpose.

Therefore, the main objective of this Doctoral Thesis has been the analytical validation of a rapid sample screening method to control the microbiological quality of cosmetic samples using flow cytometry with fluorescence detection.

To achieve this objective, the following workplan has been followed:

1- Identification of the analytical parameters of qualitative methods in the microbiological area.

2- Definition of the fitness for purpose to perform the analytical validation of a new method for the microbiological screening of cosmetic samples based on flow cytometry and fluorescence detection.

3- To study the neutralization preservative process, as a previous and fundamental stage to any microbiological analysis in cosmetic samples.

4- Evaluation of the quality parameters of the proposed method, in order to obtain the microbiological quality of the cosmetic samples in terms of aerobic viable total count of microorganisms and absence of non-permitted pathogens: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Candida albicans*.

5- To study the agreement between the developed flow cytometry - fluorescence detection method and the traditional plate seeding method using commercialy available cosmetic samples.

The main results obtained from this Doctoral Thesis are focused on three main directions: the neutralization of the cosmetic preservatives, the analytical evaluation of the critical quality parameters and, finally, the quality assessment of the commercially available cosmetics. All this studies allowed the assessment of the fitness for purpose: *to obtain cosmetic specifications compliance with identical or even better quality results in less time than the established for the traditional method.*

The neutralization of cosmetic preservatives has been carried out not only by individual inoculation of undesired pathogens, as previously indicated (*P. aeruginosa, S. aureus, E. coli* and *C. albicans*), but also including those specified in the European Pharmacopoeia (*Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis*). The optimized conditions for preservative chemical and dilution neutralization were 1:100 (p/p) dilution during 30 min, for all the cosmetic products studied.

Moreover, the evaluation of the quality parameters (false positives, false negatives, reliability, sensitivity and specificity) both in blank or individual inoculation studies of banned pathogens shower gel samples has proven the viability of the instrumental classification criterion for cosmetic samples. Likewise, it has been demonstrated that the limit of detection of the method allow to ensure the presence/absence of each pathogen as specified in all the cases examined, except for the yeast *C. albicans.*

Finally, it has been clearly demonstrated that the proposed method is a valid alternative for the analysis of common commercialized cosmetic products, *i.e.*, all specifications are accomplished (except for *C. albicans*) generating equal or even better analytical quality results than the traditional method (able to determine viable but not cultivable microorganisms) with a dramatic decrease in the analysis time (~60 %); allowing thus the assurance of the microbiological quality for all the cosmetic commercial products.

To sum up, with the sole exception of *C. albicans*, it can be concluded that analytical validation of a qualitative rapid method of cosmetic sample screening using flow cytometry with fluorescence detection has successfully been carried out allowing the control of microbiological quality of the cosmetic products commercialized by Antonio Puig S.A.

I. Objetivo y plan de trabajo 1

II. Generalidades y problemática analítica de los productos cosméticos en el ámbito microbiológico 5

II.1. Productos cosméticos y normativas de aplicación 7

II.1.1. Definición de producto cosmético y normativa 7

II.1.2. Evaluación de riesgos microbiológicos 10

II.1.3. Composición química de productos cosméticos: geles de baño 15

II.1.4. El origen de la contaminación microbiológica 26

II.1.5. Especificaciones microbiológicas en productos cosméticos 28

II.1.6. Referencias bibliográficas 31

II.2. Métodos analíticos en el ámbito de la microbiología. Citometría de flujo 33

II.2.1. Métodos microbiológicos tradicionales 33

II.2.2. Métodos microbiológicos rápidos 39

II.2.3. Citometría de flujo con detección por fluorescencia 49

II.2.4. Referencias bibliográficas 54

III. Validación de métodos analíticos cualitativos en el ámbito microbiológico 59

III.1. Métodos cualitativos 66

III.2. Validación de métodos cualitativos 72

III.3. Parámetros analíticos de los métodos cualitativos 75

III.4. Evaluación de los parámetros de calidad de los métodos cualitativos de cribado de muestras 85

III.5. Referencias bibliográficas 87

IV. Parte experimental 91

IV.1. Equipos 93

IV.2. Muestras cosméticas 94

IV.3. Cepas, medios de cultivo y *kits* de identificación 95

IV.4. Reactivos 96

IV.5. Procedimientos 97

IV.5.1. Preparación de cepas 97

IV.5.2. Recuento de cepas 98

IV.5.3. Neutralización del conservante 99

IV.5.4. Análisis por el método tradicional cosmético 102

IV.5.5. Análisis por el método de citometría de flujo 104

IV.5.6. Determinación de los parámetros de calidad 105

IV.5.7. Análisis de productos cosméticos comerciales 107

IV.6. Referencias bibliográficas 108

V. Resultados y discusión 111

V.1. Optimización de la eliminación del conservante: neutralización química y por dilución 115

V.2. Evaluación de los parámetros de calidad: establecimiento de las tablas de contingencia y las curvas características de funcionamiento 125

V.2.1. Análisis de blancos 128

V.2.2. Estudio analítico de inoculación con *Pseudomonas aeruginosa* 131

V.2.3. Estudio analítico de inoculación con *Staphylococcus aureus* 138

V.2.4. Estudio analítico de inoculación con *Escherichia coli* 147

V.2.5. Estudio analítico de inoculación con *Candida albicans* 154

V.3. Análisis de productos cosméticos comerciales. *Test* de equivalencia 162

V.3.1. Estudio de muestras positivas por el método alternativo y confirmadas como negativas por el método tradicional 165

V.3.2. Estudio de muestras dudosas por el método alternativo y confirmadas como negativas por el método tradicional 168

V.4. Evaluación del tiempo de análisis 170

V.5. Referencias bibliográficas 171

VI. Conclusiones 173

VII. Anexos 191

VII.1. Estudios realizados con blancos de reactivos 193

VII.2. Estudios realizados con blancos de muestra 195

VII.3. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de geles 215

VII.4. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en muestras de geles 235

VII.5. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en muestras de geles 254

VII.6. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* en muestras de geles 276

I. Objetivo y plan de trabajo

Dentro del ámbito de la microbiología tradicional, los métodos analíticos presentan desventajas significativas entre las que cabe destacar los elevados tiempos de análisis y la baja sensibilidad de los mismos. Para paliar estas desventajas y como alternativa al empleo de dichos métodos tradicionales, han surgido los denominados métodos microbiológicos rápidos con prestaciones analíticas mejoradas que permiten incrementar la calidad de los resultados. Este es el caso de la citometría de flujo que aun siendo una técnica muy establecida en el ámbito del análisis clínico, ha empezado a incorporarse a otros sectores tales como el análisis microbiológico de muestras cosméticas.

Dentro de este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la validación analítica de un método cualitativo rápido de cribado o de *screening* de muestras, para llevar a cabo el control de calidad microbiológico de muestras cosméticas empleando citometría de flujo con detección por fluorescencia.

Para alcanzar este objetivo general, el Plan de Trabajo llevado a cabo ha quedado constituido por las siguientes etapas:

1- Identificación de los parámetros analíticos de calidad de los métodos cualitativos en el ámbito microbiológico.

2- Definición del uso previsto (*fitness for purpose*) para establecer las líneas de actuación y llevar a cabo la validación analítica de un método nuevo de citometría de flujo con detección por fluorescencia para el cribado microbiológico de muestras cosméticas.

3- Estudio del proceso de neutralización del conservante, como etapa metodológica previa y fundamental a cualquier análisis microbiológico en muestras cosméticas.

4- Evaluación de los parámetros de calidad del método propuesto, con el fin de conseguir la calidad microbiológica de las muestras cosméticas en términos de recuento de microorganismos aerobios totales y ausencia de patógenos no permitidos: *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Candida albicans*.

5- Estudio de la correspondencia entre el método propuesto de citometría de flujo con detección por fluorescencia y el método tradicional de siembra en placa empleando muestras cosméticas comercializadas.

II. Generalidades y problemática analítica de los productos cosméticos en el ámbito microbiológico

II.1. Productos cosméticos y normativas de aplicación

II.1.1. Definición de producto cosmético y normativa

Los productos cosméticos, históricamente y desde su nacimiento, se han utilizado para ensalzar la apariencia o modificar el olor del cuerpo humano. Actualmente continúan con esta función y están ampliamente distribuidos por todo el mundo.

Los cosméticos más antiguos conocidos datan de la primera dinastía egipcia (año 3100-2907 a.C.), donde se han encontrado frascos con ungüentos y aceites perfumados en las tumbas de los faraones. Además, de esta misma época se conoce también que tanto las mujeres como los hombres, se aplicaban en la parte superior de los ojos un preparado de antimonio u hollín. Posteriormente, a lo largo de las distintas épocas, los cosméticos han formado parte de la historia. Un hecho que ha contribuido a la cosmética y la perfumería es, por ejemplo, el desarrollo y perfeccionamiento de la técnica de la destilación por parte de la cultura árabe, cuyo descubrimiento permitió posteriormente el auge de la perfumería francesa, que data aproximadamente de mediados del siglo XIV. Todo ello hasta llegar a la cosmética y perfumería tal y como la conocemos hoy, cuyos productos son utilizados ostensiblemente por la humanidad [1].

En la actualidad existe una gran variedad de cosméticos y en Europa están legislados bajo el reglamento (CE) No 1223/2009 del parlamento europeo y del consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos, el cual define un cosmético como "*toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar,*

uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales" [2]. Los productos cosméticos comprenden un vasto conjunto de productos que incluyen desde cremas, perfumes, hasta los conocidos geles de baño.

Una de las finalidades de esta normativa, específica para el sector cosmético, es que los productos en su utilización sean seguros para la salud humana, y es por ello que se basa en las Buenas Prácticas de Fabricación (UNE-EN-ISO 22716) [3] una guía publicada en el Diario Oficial de la Unión Europea.

Se entiende como Buenas Prácticas de Fabricación al conjunto de instrucciones prácticas, reglas operativas y directrices de organización, encaminadas específicamente a controlar todos los factores del proceso productivo que puedan influir en la calidad final del producto cosmético, principalmente factores humanos, técnicos y administrativos. Entre los distintos apartados que se recogen en dicha norma se encuentran los referentes a personal, locales, equipos, materias primas, producción, laboratorio de control de calidad y tratamiento de producto fuera de especificación.

Las Buenas Prácticas de Fabricación constituyen el desarrollo práctico del concepto de aseguramiento de calidad. Por tanto, todos los productos cosméticos al final del proceso productivo deben reunir unas condiciones técnico-sanitarias que estén previamente definidas y sean adecuadas para asegurar su calidad durante la vida útil del producto. Con tal motivo, se realizan los controles correspondientes para garantizar que el producto tiene el nivel de exigencia de calidad definido. Estos análisis serán

específicos para cada producto y serán definidos dependiendo principalmente de la composición y concentración de cada componente dentro del producto cosmético [2].

Además de los análisis físico-químicos, un criterio importante de calidad en la industria cosmética, es el criterio microbiológico que se realizará según el resultado obtenido en las evaluaciones de riesgo realizadas a los productos. Respecto a la calidad microbiológica, en el producto resulta preceptivo asegurar, en primer lugar, que esté libre de un tipo y número determinados de microorganismos que puedan afectar, tanto a la calidad del producto como a la salud del consumidor. En segundo lugar, es preciso asegurar que los microorganismos que se introduzcan durante la vida normal del producto, no afecten de manera negativa a la calidad y seguridad del producto [4].

II.1.2. Evaluación de riesgos microbiológicos

Con la finalidad de asegurar la calidad del producto microbiológicamente, antes de poner un producto cosmético en el mercado, es necesario primero realizar una evaluación de riesgos microbiológicos, para así determinar el nivel de análisis microbiológico a realizar (en caso de ser necesario alguno).

El grado de riesgo depende de la habilidad del producto para promover el crecimiento de microorganismos y de la probabilidad de que estos microorganismos puedan causar daño o enfermedad al usuario. Un ensayo que ayuda a ver la susceptibilidad del producto ante las cepas patógenas es el denominado *challenge test.* En este ensayo, el producto se enfrenta a las cepas patógenas de las que debe haber ausencia, que inoculadas artificialmente en el producto, determina la eficacia del conservante incorporado en la fórmula, si existe alguno. Se considera un producto bien conservado, si el nivel de contaminación se reduce hasta el nivel de aceptación.

Es importante tener en consideración especial para la formulación y control del producto, el sitio de aplicación del mismo, puesto que existen unas áreas más delicadas que otras, como los ojos o membranas mucosas frente al pelo o la piel. Además, el tipo de usuario al que va dirigido. No es lo mismo el producto dirigido a adultos, que el dirigido a niños o bebés, personas de edad avanzada o personas que muestren respuestas inmunitarias alteradas, que constituyen un segmento de la población más susceptible a las infecciones por cepas patógenas según el reglamento de cosméticos [5].

Muchos productos cosméticos poseen condiciones óptimas para el crecimiento microbiano, componentes tales como agua, nutrientes, pH y otros factores de crecimiento. Además, otros factores como la temperatura ambiente y la humedad relativa en los cuales muchos productos se fabrican, se almacenan y son utilizados por los consumidores, promocionará el crecimiento de microorganismos mesófilos causando daño a los usuarios o degradación del producto.

En esta categoría de productos se encuentran generalmente los geles de baño. Para estos tipos de productos han de aplicarse las normas recogidas en las Buenas Prácticas de Fabricación de cosméticos (ISO 22716) aplicables durante el proceso de fabricación, empleando los conservantes adecuados insertados en el desarrollo y formulación del producto, y realizando los análisis de control con los métodos apropiados.

La evaluación de riesgos está basada en una serie de factores, generalmente aceptados como importantes, al evaluar los efectos adversos en la calidad del producto y en la salud del consumidor. Por tanto, la naturaleza y frecuencia del análisis variará de acuerdo al producto en cuestión. A continuación, se describirán brevemente dichos factores.

(i) El primer factor que interviene en la evaluación de riesgo microbiológico es la **composición del producto**, en el que influyen el agua disponible de la formulación, las materias primas empleadas, el pH y el contenido en alcohol dentro de la formulación.

Como se ha mencionado anteriormente, el contenido en **agua** es uno de los factores más importantes, ya que es un medio con valor nutritivo que contribuye a aumentar el crecimiento de los

microorganismos. El contenido en agua se suele medir mediante la actividad del agua de la formulación (a_w), debido a que el agua es uno de los factores más importantes en controlar la velocidad de crecimiento de un organismo. En efecto, no es el contenido de la humedad total quien determina el potencial de crecimiento microbiano, sino el agua disponible en la formulación. El metabolismo y reproducción de microorganismos demandan la presencia de agua en forma disponible y la medida de la actividad del agua la proporciona. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* no proliferan o sobreviven en presencia de productos que tengan una actividad de agua inferior a 0.91, o *Staphylococcus aureus* que no prolifera por debajo de 0.86 [6].

La actividad del agua se define como la relación entre la presión de vapor de agua del producto y la presión del agua pura a la misma temperatura, y queda recogida en la siguiente ecuación:

$$a_w = p/p_0 = n_2 /(n_1 + n_2)$$

Donde p, es la presión de vapor de la disolución; p_0, es la presión de vapor del agua pura; n_1, es el número de moles de soluto; y n_2, es el número de moles de agua [4].

También la presencia de sustancias en materias primas, como fuente energética, tales como hidratos de carbono, proteínas, fosfolípidos, incrementa la necesidad de una adecuada preservación. El sorbitol, la glicerina e incluso agentes tensioactivos (particularmente los no iónicos), cuando se presentan a bajas concentraciones, pueden ser metabolizadas por

los microorganismos. También, es conocido el valor nutritivo de muchas gomas vegetales, polisacáridos y celulosas [7].

Otro factor que influye en la supervivencia de los microorganismos es el valor del **pH** del producto, ya que afecta al grado de ionización de las sustancias utilizadas. La carga eléctrica influirá en las paredes celulares de bacterias y hongos, influyendo, en consecuencia en la producción y la actividad de las enzimas y, por consiguiente, regulará la disponibilidad de los nutrientes y la facilidad con que se asimilan por la célula microbiana. Sin embargo, puesto que los límites de tolerancia de pH para el crecimiento de microorganismos difieren ampliamente, el pH nunca deberá considerarse por sí mismo, como un factor posible para contribuir a la autoesterilización de un producto.

El contenido en **alcohol** dentro de la fórmula del producto también es un criterio para determinar el riesgo microbiológico. Cuanto mayor sea el porcentaje en alcohol dentro del producto, más resistente será a la contaminación microbiana. Por lo general, se considera que un producto no es susceptible a la contaminación microbiana, si su contenido en alcohol es mayor de un 20 % [4].

Existen otros factores aparte, como es la **presión osmótica** que juega un papel importante en la supervivencia de organismos, ya que puede romper las membranas que rodean los cuerpos de todos los microorganismos, lo que puede originar la contracción de la membrana y la deshidratación del microorganismo. Es por esto que la presión osmótica puede tener un efecto limitante

sobre el crecimiento. Por tanto, los productos muy concentrados probablemente serán autoconservantes.

La tensión superficial y el oxígeno también son factores que intervienen en la supervivencia de los microorganismos. La tensión superficial tendrá un efecto asociado con la presencia o ausencia de grupos tóxicos en las moléculas de tensioactivos. Respecto a la presencia de oxígeno, la mayoría de los microorganismos que contribuyen al deterioro del producto son aerobios y dependen de la disponibilidad de oxígeno para su metabolismo.

(ii) Otro factor importante que interviene en la evaluación de riesgo microbiológico hace referencia a las **condiciones de fabricación** empleadas, como la temperatura, existiendo un mayor riesgo a intervalos de temperatura óptimos para el crecimiento microbiano.

(iii) El último factor a tener en cuenta en la evaluación, se refiere al **envase** empleado para la presentación del producto cosmético, disminuyendo el riesgo en aquellos que tengan protección física de contaminación durante el uso del consumidor.

II.1.3. Composición química de productos cosméticos: geles de baño

Los geles de baño, como se ha comentado anteriormente, generalmente son susceptibles de degradación biológica por microorganismos. Para comprender mejor el porqué es necesario realizar los análisis microbiológicos en geles de baño, debemos conocer su composición general.

Los componentes de los geles de baño se agrupan en distintas categorías según su función dentro de la formulación. A continuación se comentarán cada uno de ellos:

(i) **Agua.** El agua es un componente que está en un porcentaje altamente significativo en los geles de baño, y debido a que es un medio con valor nutritivo, contribuye a aumentar el crecimiento de los microorganismos. El agua es, por tanto, uno de los orígenes más habituales de contaminación microbiana. En consecuencia, es muy importante tener en consideración su calidad, contabilizando por una parte, que el recuento de aerobios totales no exceda la especificación del producto y, por otra, que no contenga la única cepa patógena que no está permitida por las especificaciones cosméticas, y cuyo origen puede proceder del agua, *P. aeruginosa*. Esta cepa puede proceder, dentro del medio acuático, de una estructura conocida como *biofilm* que puede producirse en cualquier parte de la instalación por donde circule el agua. Los *biofilms* son comunidades complejas de microorganismos, recubiertas de un polímero extracelular que les ayuda a retener el alimento y a protegerse de agentes tóxicos. Estas estructuras están fijas a una superficie y pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes [8]. Son muy resistentes y un grave

problema cuando se precisa un entorno limpio y desinfectado. Por esto que es muy importante tener un buen programa de limpieza y desinfección de las instalaciones.

Respecto al recuento de aerobios totales, es conveniente establecer dos límites, que se encuentran por debajo de las especificaciones marcadas por el producto, conocidos como: límite de alerta y límite de acción. Ambos límites se fijan en función de los resultados que históricamente se hayan obtenido en esa instalación. El propósito de establecer estos límites, es mantener las instalaciones en buen estado, evitando los niveles de contaminación muy elevados, y la formación de *biofilms*, pues son de gran resistencia y una vez creados, es muy compleja su eliminación. Cuando en los resultados, el número de microorganismos llega al nivel de alerta, es fundamental realizar un seguimiento y ver la tendencia de los resultados. Si el número de microorganismos va incrementando y llega al nivel del límite de acción, es necesario actuar mediante una desinfección exhaustiva de la instalación.

Además, hay que tener en cuenta que el agua, como materia prima fundamental en los geles de baño, es, adicionalmente, el elemento vehicular del resto de componentes.

(ii) **Tensioactivos**. Después del agua son los componentes mayoritarios de los geles de baño. La molécula tensioactiva tiene una parte hidrófila (grupo polar) y una parte hidrófoba que hacen que se orienten cambiando la tensión superficial del agua. Los tensioactivos por tanto, tienen la propiedad de formar micelas, que dentro de la formulación del producto ayuda a solubilizar

sustancias como el perfume, pero además estas estructuras son las causantes de la eliminación de la suciedad, puesto que la suciedad se solubiliza en el interior de las micelas (parte apolar) y las arrastra de la piel. Tienen propiedades detergentes y espumógenas, y además son químicamente estables.

A la hora de formular un gel de baño, es importante incorporar el tensioactivo correcto y concentración adecuada, puesto que cuando la propiedad detersiva es excesiva, la piel se desengrasa más pudiendo disminuir excesivamente su película hidrolipídica, llegando, en algunos casos extremos a profundizar y formar compuestos de adición con la queratina epidérmica e influir en la actividad enzimática celular. También a considerar que el exceso de tensioactivos favorece la absorción percutánea y así componentes como los disolventes, colorantes, perfumes, etc…, podrían ejercer influencias selectivas indeseables sobre los procesos metabólicos.

En la formulación de un gel de baño, generalmente se utiliza mezcla de varios tensioactivos, buscando equilibrar el nivel de alguna de sus propiedades como la indicada anteriormente (detersiva), o bien para potenciar otras (como la espumosidad), o bien para disminuir otras (como la irritabilidad) [9].

Los tensioactivos se clasifican según su composición química en:

a. Aniónicos: son aquellas moléculas en las cuales el ion tensioactivo está cargado negativamente en disolución. Ejemplos de ellos son los alquil-sulfatos, sulfonatos, fosfatos,

alquilaril sulfonatos, sulfosuccinatos, isotianatos éter alquil sulfatos, taurinas y sarcosinatos.

b. Catiónicos: se caracterizan por el hecho de que el ion tensioactivo está cargado positivamente en disolución acuosa. Ejemplos son las sales de amonio, aminas cuaternarias, sales de alquil piridinio y sales de fosfonio.

c. No iónicos: se caracterizan por el hecho de que la parte hidrófila de la molécula generalmente está constituida por una multiplicidad de pequeños grupos polares no cargados. Encontramos entre otros la alcanolamida y dialcanolamida de ácidos grasos, éteres de alquil poliglicol, ésteres de poliglicol y óxidos de amina.

d. Anfóteros: se caracterizan por su capacidad para formar un ion tensioactivo con cargas tanto positivas como negativas. Los principales son los betaínicos y los imidazolínicos.

Los tensioactivos provocan la eliminación de la suciedad cutánea a través de las micelas que generan, como hemos comentado anteriormente y muchos incluyen la eliminación de los microorganismos, ya que tienen una acción antibacteriana propia, como son los de tipo catiónico, pero no son esporicidas. La actividad germicida de los tensioactivos depende principalmente del pH, siendo activos los aniónicos a pH alcalino, mientras que los catiónicos lo son a pH ácido. Si se asocian ambos, se pierde mucho esta propiedad germicida ya que los aniones se pueden intercambiar con los cationes más tóxicos. Los tensioactivos no iónicos sin embargo no son bactericidas, sino que, por el contrario

favorecen el crecimiento de los microorganismos ya que éstos son capaces de metabolizar alguna de sus cadenas grasas (como puede ser el ácido oleico).

(iii) **Espesantes**. Estas sustancias ayudan a incrementar la viscosidad del producto, y en los geles de baño con base tensioactiva, nos encontramos con compuestos espesantes como la hidroxicelulosa, carbomer, polietilenglicol y sales inorgánicas.

(iv) **Humectantes**. Son componentes que mantienen la hidratación en la piel, bien aportándole agua directamente, o bien evitando la pérdida de agua ocluida en la misma. Ejemplos de ellos son la glicerina, propilenglicol o el sodio-PCA.

(v) **Solubilizantes**. Son sustancias que ayudan a homogeneizar determinados componentes del producto como puede ser el perfume que es lipófilo en medio hidrófilo. Ejemplos de solubilizantes son el PEG-40, aceite de ricino, Tween 80 o polisorbato 20.

(vi) **Emolientes**. Su función es aportar suavidad, reponiendo la parte lipídica que necesita la piel, y que posiblemente, ha sido arrastrada en exceso por la parte tensioactiva del gel de baño. Entre este grupo de materias primas está el isopropil miristato.

(vii) **Antioxidantes**. Estas moléculas de gran importancia en el ámbito de la salud evitan el envejecimiento por oxidación del producto y se utilizan sobre todo para evitar oxidaciones de los perfumes incluidos en la formulación y evitar así olores desagradables. Un ejemplo es el BHT (butil hidróxido tolueno).

(viii) **Colorantes**. Aportan la coloración deseada al producto definida por los formuladores y por *marketing* a la hora de crear un producto. Ejemplos de ellos son: Yellow 5 (C.I. 19140), Blue 1 (C.I. 42090), Red 33 (C.I. 17200), Red 4 (C.I. 14700).

(ix) **Factores de suspensión**. Son compuestos que ayudan a mantener en suspensión a otros componentes. Algunos son espesantes (carbomer y hidroxietilcelulosa).

(x) **Reguladores de pH**. Son aquellas sustancias que ayudan a controlar el pH, dentro de un intervalo determinado establecido que, generalmente, estará en torno al pH de la piel (5.5). Entre los reguladores de pH usados habitualmente están: el ácido fosfórico, el ácido láctico, el ácido cítrico, trietanolamina y el hidróxido sódico. Además hay que tener en cuenta, que el valor establecido de este parámetro no perjudique la actividad de los diferentes materiales de formulación, y en particular del conservante, puesto que la mayoría sólo son activos a un pH determinado.

(xi) **Secuestrantes**. Tienen por función secuestrar cationes que se encuentran en aguas duras que impiden la acción de los tensioactivos. En el ámbito de la microbiología, además facilitan la actuación del conservante en la eliminación de posible contaminación microbiana, facilitando el paso de dicho conservante, a través de la membrana de los microorganismos. Ejemplos de éstos son las sales di y tetrasódicas de EDTA.

(xii) **Acondicionadores**. Proporcionan a la piel y al pelo una mejora en su estado, sobre todo a lo referente al tacto de la misma. Entre

ellos encontramos el Polyquaternium 7, Polyquaternium 39 y las siliconas.

(xiii) **Perfume**. Tiene como misión dar un buen olor al producto y cubrir los malos olores que pudiesen provenir de la base del gel. Es una composición equilibrada y armónica de olor preparada con aceites esenciales naturales y productos químicos aromáticos definidos. Los perfumes, al igual que en la música, se definen en base a las notas, que en el caso del perfume, son las materias primas que lo componen (limón, rosa, cedro…). Con estas notas se forman los acordes que combinados entre sí en las proporciones adecuadas crean el perfume (cítrico, floral, *chypre*…). Existen las notas de salida, que son las que se perciben inmediatamente después de la aplicación del producto, y que en los geles están más acentuadas puesto que es un producto de *wash-off* (eliminación). También están las notas intermedias, y, por último las de fondo que son las que más permanecen.

Con la serie de materias primas presentadas, conseguiremos formular la denominada base del cosmético.

Además, en la formulación, se pueden añadir, o no, un grupo de materias primas denominadas **principios activos.** Su adición dependerá de los requerimientos de mercado, de la actividad que se desprenda del producto cosmético o de la necesidad de preservar un producto, tanto de microorganismos con la utilización de conservantes, como de las radiaciones ultravioletas, en cuyo caso se utilizan filtros químicos, o de oxidaciones de cualquiera de los componentes del producto por interacciones con el envase o bien por la naturaleza de los mismos. En productos de tratamiento, existe infinidad de materias primas que

responden con su actividad, a multitud de propiedades como por ejemplo activos despigmentantes, reafirmantes, hidratantes, antirradicales libres, extractos y aceites vegetales para distintas funciones, exfoliantes, cicatrizantes y desodorantes.

Dentro de la formulación de un gel, un principio activo muy importante (casi imprescindible) es el **conservante**. El conservante, dentro del producto cosmético, tiene dos papeles importantes. El primero, evitar el deterioro del producto por población microbiana, y el segundo, proteger al consumidor de alguna posible infección. Una observación importante, es que *la preservación de cosméticos mediante conservantes, nunca debe utilizarse para ocultar una mala praxis de fabricación, sino para mantener el producto en perfecto estado durante la vida útil del mismo*.

Existen dos tipos de conservantes, los bacteriostáticos, que inhiben el crecimiento y proliferación de bacterias en unas condiciones definidas, y los microbicidas que provocan la destrucción y muerte de las bacterias. Es importante que los conservantes, en la formulación de un producto cosmético, vayan en la cantidad óptima de manera que eliminen o inhiban el crecimiento de microorganismos que puedan contaminar el producto, pero en cantidad mínima para que no afecten de manera negativa al consumidor (por posibles reacciones adversas que pueda provocar). Es por esto que los conservantes permitidos y su concentración máxima en las cuales han de utilizarse están recogidos en el Reglamento sobre productos cosméticos [2]. Entre los más utilizados se encuentran las isotiazolinonas, los parabenos, 2-bromo 2-nitro 1,3 propanodiol, alcohol bencílico, benzoato sódico y sorbato potásico, entre otros.

El espectro antimicrobiano del sistema conservante utilizado en un cosmético influirá en el crecimiento de los microorganismos, ya que como

en el medio natural, en un cosmético existe competición por los nutrientes existentes entre los microorganismos, de modo que un microorganismo sobrevivirá y crecerá con más éxito que otro. Así, donde un conservante es activo frente a un espectro limitado de microorganismos, el producto puede ser susceptible al deterioro por microorganismos menos sensibles al sistema de preservación, por lo que es importante que el sistema conservante abarque el abanico más amplio posible de microorganismos.

Los microorganismos susceptibles de contaminar un gel de baño cosmético, pertenecen al grupo de las bacterias, de las levaduras y de los mohos y si los que se encuentran son potencialmente patógenos, el uso de un gel de baño puede conllevar un riesgo para el usuario. Es por ello, que se presta especial atención a la detección de patógenos de la piel como son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* ya que estos pueden causar infecciones de piel u ojos. La detección de otros microorganismos pueden ser de gran interés, como es el caso de *Escherichia coli* pues es un indicador de higiene durante el proceso de fabricación [5]. Por esta razón, la detección de estos patógenos está incluida en las especificaciones microbiológicas que veremos posteriormente al final de este apartado.

La sensibilidad al ataque microbiano dependerá también de la temperatura. Por lo general, las bacterias proliferan a temperaturas comprendidas entre 30-37 ºC y los mohos y levaduras entre 20-25 ºC [9]. En consecuencia, es importante también la temperatura de almacenamiento del producto, ya que si permanece en el intervalo de crecimiento, es probable que aumente la probabilidad de crecimiento de población si la hubiera.

Si el producto es atacado por microorganismos, el consiguiente deterioro del producto por población microbiana, puede reflejarse en cambios en el color del producto (como resultado de alteraciones en el pH, o alteraciones en el potencial redox, o debido a la producción de pigmentos originados por algunos microorganismos como, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), producción de gas por los procesos metabólicos de algunos microorganismos, producción de olores desagradables, o cambios en la textura del producto. Por tanto, cuando un producto cosmético se ve afectado por una población microbiana, puede perderse la estética del producto, con la consiguiente pérdida de beneficios que aportan sus diferentes componentes o principios activos.

Además de estos cambios en el producto, y más importante aún, los microorganismos potencialmente existentes en un gel cosmético, podrían producir riesgos para la salud del consumidor. Este riesgo disminuye en individuos normalmente sanos, puesto que poseen considerable resistencia a la infección por bacterias y hongos, pero en individuos sensibles, como los niños, ancianos o enfermos, existe una probabilidad mayor de desarrollo de las infecciones.

Varios factores explicados anteriormente en la evaluación de riesgos microbiológicos, determinan si los microorganismos sobrevivirán y se propagarán en un producto, y por tanto, éstos influyen en la decisión sobre la necesidad de incorporación de conservantes.

Para realizar el análisis microbiológico de un gel de baño y detectar los posibles microorganismos existentes en una muestra, es esencial en primer lugar, la neutralización o eliminación del conservante de la muestra cosmética [10]. En la práctica, no efectuar la neutralización del conservante, conlleva que los microorganismos existentes en la muestra,

no aparezcan, o aparezcan en menor medida, que los que contiene la muestra originalmente en el momento del análisis, conduciendo así a resultados erróneos [11]. Estos resultados erróneos pueden ocultar una mala praxis del proceso de fabricación que pueden producir ulteriormente un riesgo para la salud del usuario.

Existen tres tipos de neutralización del conservante: por filtración y lavado, por inhibición química y, por último, por dilución. Estos métodos pueden utilizarse individualmente o combinados entre sí, para conseguir una buena neutralización.

La neutralización por filtración y lavado, consiste en la retención física de los microorganismos en un filtro de membrana cuando pasa la muestra a través de ella. En este tipo de neutralización es importante asegurarse, que no quedan adheridos a la membrana residuos de agentes antimicrobianos, que puedan causar la inhibición del crecimiento de los microorganismos retenidos en ella [10, 11].

La neutralización química la aportan los agentes químicos del caldo de cultivo, el cual lleva neutralizantes de conservantes cosméticos. Con la neutralización por dilución, no sólo se ayuda a la disminución de la concentración del conservante, sino que también ayuda a acondicionar la muestra cosmética, ya que el análisis directo de la muestra sin dilución, no es posible debido a la viscosidad del producto.

II.1.4. El origen de la contaminación microbiológica

El origen de una contaminación microbiana puede provenir de diversas fuentes:

(i) De las **materias primas** utilizadas para la elaboración del producto. Si éstas están altamente contaminadas, entonces es casi inevitable que el producto final esté también contaminado y todo el sistema conservante presente será contrarrestado. Este problema puede evitarse controlando cuidadosamente las materias primas susceptibles de contaminación para evitar incorporar microorganismos a la fabricación del producto. El agua utilizada en la fabricación del producto es posiblemente el origen más frecuente de contaminación. Otras sustancias que también son susceptibles de contaminación son las sustancias naturales, tanto de origen vegetal (gomas, hierbas, extractos…), como mineral (talco, caolín, yeso…) [7]. Las grasas, ceras y aceites refinados, por el contrario, contienen relativamente pocos microorganismos.

Hay que prestar especial atención a los envases en los cuales vienen estas materias primas (bidones, sacos, embalajes), puesto que si vienen sucios, al manipularlos, esta población procedente de la suciedad, puede incorporarse en la fabricación y por tanto, también pueden ser origen de la contaminación en el producto final.

(ii) Del **aire**, que contiene principalmente hongos, esporas bacterianas y cocos cutáneos. Un tratamiento mediante filtración del aire en salas blancas o tratadas, reduce los contaminantes mejorando la

calidad del aire en zonas donde el producto esté en contacto directo con el aire.

(iii) De los **equipos e instalaciones** de la planta, consecuencia de una limpieza deficiente o inadecuada. De ahí la necesidad de buenos procedimientos de limpieza y la importancia de la formación de los trabajadores de la planta para que comprendan la necesidad de efectuar adecuadamente estas operaciones.

(iv) De los **operarios,** pues son un origen potencial de contaminación (sobre todo de cocos cutáneos) y, como se ha mencionado anteriormente, deben ser instruidos en Buenas Prácticas de Fabricación.

II.1.5. Especificaciones microbiológicas en productos cosméticos

En la actualidad los cosméticos están legislados según el reglamento (CE) No 1223/2009 del parlamento europeo y del consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos, que establece que estos productos han de ser seguros para el consumidor. Para garantizar la seguridad del producto y el consumidor, la normativa se basa en las Buenas Prácticas de Fabricación de la ISO 22716, en la cual se hace mención a las especificaciones microbiológicas a través de la evaluación de riesgos.

La evaluación de riesgos, como hemos visto anteriormente, es una herramienta o instrumento que ayuda a saber cuándo la aplicación de las Normas Internacionales de microbiología ISO y métodos correspondientes, no son obligatorios.

En los geles de baño, al ser por lo general productos de alto riesgo microbiológico por las características intrínsecas del producto y los resultados obtenidos en los *challenge test* (procedimiento mediante el cual se mide la eficacia del conservante), se han de realizar normalmente los análisis microbiológicos cuyas especificaciones vienen definidas en la Norma Internacional "Cosméticos. Microbiología. Límites microbiológicos (UNE-EN-ISO 17516:2014)" [12]. Estos límites se adoptan en esta Tesis Doctoral y se muestran a continuación en la **Tabla II.1.**

Tabla II.1. Especificaciones microbiológicas cosméticas.

Especificación	Uso general	Uso específico [a]
Recuento máximo de MAVT [b] (u.f.c.[c] / g o mL de producto)	≤ 1000	≤ 100
Ausencia / g o mL de producto de las cepas	*Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Candida albicans*	

[a] Aplicados en el contorno de los ojos y en los cosméticos destinados a bebés; [b] MAVT: microorganismos aerobios viables totales. [c] Unidades formadoras de colonias

Para la determinación de cada uno de los parámetros es necesario aplicar las Normas Internacionales microbiológicas siguientes:

- Guía para el análisis del riesgo y la identificación de producto con bajo riesgo microbiológico (UNE-EN-ISO 29621) [4]
- Detección y recuento de bacterias aerobias mesófilas (UNE-EN-ISO 21149:2010) [13]
- Cosméticos. Microbiología. Enumeración de levaduras y mohos. (ISO 16212:2008) [14]
- Cosméticos. Microbiología. Detección de microorganismos específicos y no específicos. (ISO 18415:2007) [15]
- Instrucción general para el examen microbiológico (UNE-EN-ISO 21148:2010) [16]
- Detección de *Escherichia coli* (UNE-EN-ISO 21150:2010) [17]
- Detección de *Pseudomonas aeruginosa* (UNE-EN-ISO 22717:2010) [18]

- Detección de *Staphylococcus aureus* (UNE-EN-ISO 22718:2010)[19]
- Detección de *Candida albicans (UNE-EN-ISO 184*16:2010) [20]

Resulta preciso indicar que, el **criterio de aceptación** para el recuento de microorganismos aerobios viables totales para la calidad microbiológica definida en la ISO 17516, se adopta del descrito en las Farmacopeas Europea y Americana:

10^1 u.f.c.: recuento máximo aceptable: 20
10^2 u.f.c.: recuento máximo aceptable: 200
10^3 u.f.c.: recuento máximo aceptable: 2000

Es decir, si el límite establecido es de 10 u.f.c., se acepta hasta 20 u.f.c., por la variabilidad existente en los resultados microbiológicos.

II.1.6. Referencias bibliográficas

[1] Microbiología y conservación de cosméticos, Curso SEQC (Sociedad Española de Químicos Cosméticos), 2003.

[2] Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del parlamento europeo y del consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos, Diario Oficial de la Unión Europea L 342/59.

[3] Cosmetics - GMP - Guideline on Good Manufacturing Process, ISO 22716: 2007.

[4] Cosmetics - Microbiology - Guidelines for the Risk Assessment and Identification of Microbiologically Low-Risk Products, ISO 29621: 2010.

[5] Cosmetics - Microbiology - Detection of specified and non-specified microorganisms, ISO 18415: 2007.

[6] <1112> Application of Water Activity determination to non-sterile Pharmaceutical Products, USP 31 (2008) 580-581.

[7] Comité Asesor de cosmetología, Guía de Cosmetología. Manual para el Control Microbiológico de Productos Cosméticos, Ministerio de Sanidad y Consumo (1994).

[8] J.W. Costerton, Overview of microbial biofilm, J. Indus. Microbiol. 15 (1995) 137-140.

[9] J.B. Wilkinson, R.J. Moore, Cosmetología de Harry, Ediciones Díaz de Santos, 1990.

[10] Microbial recovery by using neutralizing media, Journal of Hygiene Sciences, (2008) 7- 8.

[11] H. Mehrgan, F. Elmi, M. R. Fazeli, A. R. Shahverdi, and N. Samadi, Evaluation of neutralizing efficacy and Possible Microbial Cell Toxicity of a Universal Neutralizer proposed by the CTPA, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3 (2006) 173-178.

[12] Cosméticos – Microbiología - Límites microbiológicos, UNE-EN-ISO 17516: 2014.

[13] Cosmetics – Microbiology - Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria, ISO 21149: 2010.

[14] Cosméticos – Microbiología - Enumeración de levaduras y mohos, ISO 16212: 2008.

[15] Cosméticos – Microbiología - Detección de microorganismos específicos y no específicos, ISO 18415: 2007.

[16] Cosmetics – Microbiology - General instructions for microbiological examination, ISO 21148: 2010.

[17] Cosmetics – Microbiology - Detection of *Escherichia coli*, ISO 21150: 2006.

[18] Cosmetics - Microbiology - Detection of *Pseudomonas aeruginosa*, ISO 22717: 2006.

[19] Cosmetics – Microbiology - Detection of *Staphylococcus aureus*, ISO 22718: 2006.

[20] Cosmetics – Microbiology - Detection of *Candida albicans*, ISO 18416: 2007.

II.2. Métodos analíticos en el ámbito de la microbiología. Citometría de flujo

II.2.1. Métodos microbiológicos tradicionales

La microbiología, como ciencia especializada, no aparece y se consolida hasta finales del siglo XIX. Ésta nace como consecuencia de la confluencia de una serie de progresos metodológicos que se habían empezado a gestar lentamente en los siglos anteriores [1].

Los ensayos microbiológicos poseen particularidades que los diferencian de los ensayos físico-químicos. La principal peculiaridad es que se trabaja con microorganismos, es decir, con seres que tienen la capacidad de multiplicarse por división binaria y crecer exponencialmente. Debido a este motivo, los análisis microbiológicos, se encuadran en la categoría de los ensayos que no permiten realizar un cálculo riguroso metrológica y estadísticamente válido de la incertidumbre de medida [2], por lo que existe una dificultad añadida en los estudios microbiológicos a diferencia de los físico-químicos.

Los métodos de análisis microbiológicos convencionales, se corresponden con técnicas empleadas ya en el siglo XIX y siguen siendo muy utilizados todavía hoy en día. Estas técnicas se basan en la detección visual de los microorganismos a través de medios de cultivo [3, 4].

Los **medios de cultivo,** por definición, son medios que constituyen un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que suministran los requisitos necesarios para el desarrollo de los microorganismos. Algunos microorganismos pueden crecer satisfactoriamente en casi cualquier medio de cultivo, otros, sin embargo, necesitan medios especiales y específicos para su desarrollo.

Además de estos microorganismos que crecen en medios de cultivo, existen también otros, que no pueden crecer en ninguno de los medios desarrollados hasta ahora, o que sólo pueden crecer en medios de cultivo cuando las condiciones que los rodean se vuelven favorables para ellos. Esta categoría de microorganismos se les ha denominado microorganismos viables pero no cultivables. Se cree que el estado de viable pero no cultivable, es una estrategia de supervivencia, un estado de adormecimiento hasta que las condiciones ambientales sean más favorables.

Existe gran variedad de medios de cultivo que pueden clasificarse de diversas maneras. Por una parte, se pueden clasificar por el estado físico en el que se encuentran: líquidos o caldos, sólidos (a los cuales se les añade un agente solidificante denominado agar-agar), o semisólidos (los cuales poseen también agar-agar pero en menos concentración que en los sólidos).

Los medios también pueden clasificarse según su utilización. En este sentido, encontramos los **medios generales**, que son medios de cultivo cuya característica general es que en ellos se pueden desarrollar una gran variedad de microorganismos con distintos requerimientos nutricionales. Normalmente, éstos son utilizados para cuantificar la totalidad de los microorganismos existentes en una muestra.

En otras ocasiones, es necesario llevar a cabo la búsqueda y detección de microorganismos específicos, lo que se consigue mediante el aislamiento de éstos y su posterior identificación con *kits* bioquímicos.

En repetidas ocasiones junto con la cepa diana pueden convivir otras cepas que enmascaren y dificulten la búsqueda de la que queremos

identificar. En estos casos es recomendable utilizar medios de cultivo que ayuden a separar y diferenciar dichos microorganismos, o que de forma selectiva, favorezcan el crecimiento de alguno de ellos. Estos medios de cultivo se denominan específicos.

Así mismo, los medios específicos se dividen en **medios selectivos**, los cuales sólo permiten el crecimiento de un tipo determinado de microorganismos, inhibiendo el desarrollo de los demás, y en **medios diferenciales**, que son diseñados para distinguir unos microorganismos de otros, a partir de una población mixta, por la apariencia distinta que toman sus colonias [5].

Generalmente, todos estos medios, tanto generales como específicos, son las herramientas utilizadas en los métodos tradicionales microbiológicos. En estos métodos, a partir de la siembra de las muestras en los diferentes medios de cultivos apropiados a cada microorganismo y, manteniendo siempre las condiciones idóneas de temperatura y tiempo, se visualizarán las colonias correspondientes a los microorganismos o unidades formadoras de colonias que contienen las muestras.

Referente al método tradicional microbiológico existen tres tipos de determinación específica [6, 7, 8]:

(i) El análisis de presencia o ausencia de microorganismos en el cual sólo es necesario saber si existe o no presencia de microorganismos sin atender a la cantidad encontrada. Un ejemplo es el análisis de presencia o ausencia en la determinación de una cepa prohibida por legislación dentro de una muestra.

(ii) Análisis de cuantificación de los microorganismos existentes para aquellos análisis en que sea determinante conocer el número de microorganismos existentes en una cantidad de muestra.

(iii) Análisis de identificación para conocer el género y especie de microorganismos dentro de una muestra.

Aunque hoy en día, las técnicas de siembra en placa siguen siendo las más utilizadas y accesibles para la detección microbiana, sin embargo, éstas presentan una serie de desventajas significativas. La primera de ellas, es que son **protocolos lentos** [4, 8, 9], pudiéndose emplear tiempos que están comprendidos entre varios días a dos semanas. Este tiempo empleado es debido a que su principio de medida está basado en la amplificación de la señal a través del crecimiento de los microorganismos, y se traduce por tanto, como el paso de una célula o unidad formadora de colonia, a una colonia detectable visualmente. Esta detección visual, al depender del ojo humano, se convierte en otra desventaja puesto que es una detección basada en la subjetividad.

Esta lentitud de los análisis microbiológicos, consecuentemente, es perjudicial para las industrias, ya que afecta al tiempo de liberación de producción, lo que conlleva aumento de *stocks* y, en definitiva, a un aumento económico. Además, debido a esta lentitud en la obtención de resultados, cuando existen problemas de origen microbiológico, el tiempo de reacción sobre ellos es mayor y por tanto, casi siempre, las acciones sobre el problema, son correctivas en vez de proactivas.

La segunda desventaja importante es la **falta de sensibilidad** [4, 6, 10, 11] del método, pues el crecimiento de los microorganismos y por tanto la

detección, están limitados por una serie de parámetros como son la temperatura, la presión, la salinidad, los nutrientes disponibles en el propio medio de cultivo, las interacciones entre las poblaciones de microorganismos y las condiciones de incubación. Muchos de los microorganismos existentes en una muestra tienen requerimientos de crecimiento muy diferentes de las condiciones estándar que frecuentemente se aplican, subestimando, por tanto, el verdadero contaje de células viables. Por tanto, se reduce la aparición de los microorganismos realmente existentes en la muestra.

En los medios de cultivo, por tanto sólo crecerán aquellos microorganismos capaces de proliferar en las condiciones especificadas (denominados cultivables), disminuyendo el número en el recuento total de microorganismos existentes [4] pudiendo guiar a resultados falsos negativos. Por ende, se pierde la información sobre la presencia de bacterias que no forman colonias, pero que sin embargo, son activas metabólicamente. En este sentido, no hay evidencia explícita de que si una bacteria no se reproduce, siendo activa metabólicamente, indique que la célula esté muerta [12].

Cuando los microorganismos están estresados, porque se encuentran en diferentes condiciones de las apropiadas para su crecimiento, éstos pueden residir en un estado fisiológico de adormecimiento. A estos microorganismos en este estado se denominan microorganismos viables pero no cultivables. Por tanto, mientras permanezcan o existan en este estado de adormecimiento, éstos pueden bien no crecer en medios de cultivo puesto que no son capaces de producir suficiente biomasa para formar colonias o turbidez, existir solamente en una pequeña fracción de la totalidad de la población, o bien sólo crecer después de una fase de

latencia, en cuyo caso cesa el crecimiento después de un número limitado de divisiones [11]. Además de esto, existen otras peculiaridades como que haya microorganismos que no crezcan en medios selectivos como le ocurre por ejemplo a un tipo de *E. coli*, o que algunos pueden cambiar su forma de bacilos a cocos o inclusive incremente su resistencia a los factores de estrés ambiental [13, 14]. Sin embargo, este estado de no cultivable puede cambiar cuando entran en un ambiente apropiado para los microorganismos [15].

Por último, es preciso indicar también que en el desarrollo de los métodos tradicionales, se obtiene una **gran variabilidad** en los resultados, encontrándonos variaciones comprendidas entre un 15 a 35 % en términos de desviación estándar relativa (RSD), frente a los valores tradicionales de los análisis químicos situados entre 1 y 3 % [7]. Esta variabilidad es debida principalmente a un error en la distribución de los microorganismos en la muestra, pues la distribución natural de los microorganismos es heterogénea y raramente sigue una distribución Gaussiana normal. En el caso de los microorganismos la distribución que siguen es la de Poisson, en la cual es difícil evaluar y predecir su número a bajos niveles de concentración de microorganismos. Además de esto, existe una variabilidad inherente en los resultados que puede ser más crítica que en el caso de métodos analíticos convencionales, y es derivada de errores de muestreo, dilución, siembra, incubación, operario, de la actividad metabólica y de la morfología de la célula (ya que puede estar sola, en pareja, o en agrupaciones irregulares) [6, 16].

II.2.2. Métodos microbiológicos rápidos

Los métodos microbiológicos rápidos o como se denominan habitualmente en su término en inglés *Rapid Microbiological Methods* (RMM) están diseñados para dar equivalencia analítica a los métodos de referencia, pero generando resultados en menos tiempo. El método alternativo a utilizar deberá asegurar un resultado igual o mejor que el conseguido con el método de referencia [17].

La implantación de métodos microbiológicos rápidos es la solución analítica frente a los métodos de análisis microbiológicos tradicionales, ya que palian las principales desventajas de los métodos convencionales comentadas anteriormente.

Además, el interés de las industrias por los métodos microbiológicos alternativos rápidos ha crecido mucho en los últimos años, debido en parte a una nueva tendencia en calidad denominada Tecnología Analítica de Procesos (PAT, *Process Analytical Technology*) como parte integrante de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) en el área farmacéutica. El objetivo del PAT requiere que durante la elaboración de los productos, se realice el análisis de materiales y procesos, para asegurar la calidad de los productos finales. Por tanto, requiere que los análisis y resultados, en la medida de lo posible, se obtengan a tiempo real. Respecto a los análisis microbiológicos en tiempo real según requiere el PAT, sólo pueden ser realizados por métodos microbiológicos alternativos rápidos [4].

Actualmente, algunos de los métodos microbiológicos rápidos existentes, tienen el potencial de obtener resultados a tiempo real o casi a tiempo real y, además, pueden también ofrecer una mejora en la calidad de los análisis. Por tanto, a nivel industrial, minimizan los problemas de

contaminación, reducen el coste de almacenaje e incrementan el nivel de satisfacción del cliente. En general, los métodos microbiológicos rápidos mejorarán la calidad y eficiencia en la producción.

Hay que tener en cuenta a la hora de comparar resultados entre el método alternativo y tradicional, que algunos de los métodos alternativos utilizan distintos principios de medida, metodologías y por tanto, miden distintas entidades como es por ejemplo el adenosina trifosfato (ATP) o la actividad enzimática de las esterasas y, por tanto, también miden distintas señales analíticas (bioluminiscencia o fluorescencia), en comparación con el método tradicional de referencia, que mide u.f.c. Además, también hay que tener en cuenta que las u.f.c. contabilizadas en el método tradicional, no sólo parten de una célula, sino que éstas pueden partir de una célula o miles de ellas, y se vuelven visibles sólo después de su proliferación, en decenas de millones de ellas a las cuales se denominan colonias [17, 18]. Por tanto, la correlación entre los distintos métodos (alternativo y de referencia) no resulta sencilla de interpretar en muchos de los casos presentando una importante dificultad.

Dentro de los métodos alternativos microbiológicos rápidos existen cuatro categorías que se explican a continuación [8].

En la primera categoría se encuentran los **métodos basados en el crecimiento**, los cuales detectan la presencia/ausencia de los microorganismos en un período de más de 24 horas. Estos métodos se basan en la habilidad de recuperar y detectar organismos de los productos y demostrar su viabilidad por multiplicación en medios de cultivo [6, 17]. Se pueden clasificar a su vez en métodos que miden la detección temprana del crecimiento, y en métodos que han desarrollado medios de cultivo para la mejora de la detección, como los medios cromogénicos. A

continuación se explican brevemente los métodos de detección temprana del crecimiento.

El método de **impedancia electroquímica** mide el crecimiento o actividad microbiana en un medio de cultivo durante el período de incubación. Cuando los microorganismos se multiplican, metabolizan nutrientes orgánicos que se transforman, desde moléculas más grandes y poco cargadas eléctricamente, en metabolitos iónicos más pequeños altamente cargados. Si en los vasos de cultivo y en contacto con el medio de cultivo se sitúan dos electrodos, la carga iónica puede detectarse y registrarse por impedancia, la cual evalúa la resistencia al flujo de una corriente alterna a través de un material conductor. Cuando los microorganismos alcanzan un número crítico (10^5 – 10^6 u.f.c./mL) hay un importante incremento en la impedancia [6,8]. Los factores críticos de esta técnica son la temperatura y el medio de cultivo (para la optimización de la señal eléctrica). El tiempo de reducción del análisis es de 48 horas frente al del método tradicional. Esta técnica se ha aplicado en la industria cosmética desde los años ochenta [3].

Otra técnica basada en el crecimiento de los microorganismos es la medida de **consumo o producción de gas** por parte de dichos microorganismos. Su principio de medida se basa en los cambios detectados en la composición gaseosa en el espacio de cabeza (*head-space*), producido por los organismos que se multiplican y metabolizan en un medio de cultivo apropiado, dando lugar a la producción de metabolitos o eliminación de nutrientes. Esta monitorización se lleva a cabo en botellas de cultivo cerradas, en las cuales unos transductores eléctricos de presión responden a cambios de presión positivos o negativos, por ejemplo la producción de CO_2 o consumo de O_2 [6, 8]. Existen

otros indicadores que pueden ser empleados como, por ejemplo, la colorimetría para la detección de CO_2, que se basa en el cambio de color de un substrato al interaccionar con el CO_2 producido por el crecimiento de los microorganismos [6]. Estos sistemas son denominados sistemas de detección microbiana no invasivas, y son más utilizadas en el área clínica para los cultivos de sangre. Además, ofrecen una detección más rápida para microorganismos de crecimiento lento, como la detección de las micobacterias [3].

Las técnicas analíticas basadas en **bioluminiscencia** son otra alternativa en este tipo de métodos para el análisis de microorganismos y son más utilizadas que las anteriores por la industria [4]. El ATP es un indicador de viabilidad en las células [6, 8], ya que todas las células almacenan energía en forma de ATP. Un incremento en el número de células da como resultado un aumento de los niveles de ATP. En su utilización, este método necesita en primer lugar la extracción del ATP endógeno de los microorganismos. Seguidamente se utiliza el sistema enzimático luciferin/luciferasa, el cual emite luz en proporción al ATP presente [4, 6, 19]. La luz emitida se mide con un bio-luminómetro y su resultado se expresa en URL (unidades relativas de luz). En esta técnica, el tiempo de análisis se reduce a una tercera parte con respecto al empleado en el método tradicional. En efecto, la detección es rápida (1 hora) si el producto analizado contiene un alto nivel de contaminación bacteriana (alrededor de 500 - 1000 u.f.c.). Para bajos niveles de contaminación (menos de 100 u.f.c.) es necesario incrementar el número de microorganismos mediante un paso de incubación previo a la detección, en un medio de cultivo durante 12 - 48 horas dependiendo del método empleado. Después de este tiempo, una célula es capaz de

incrementar su crecimiento en 1000 veces mejorando notablemente la detección.

El contenido de ATP varía de un microorganismo a otro, siendo menor en bacterias (1-10 fg por célula) que en hongos (alrededor de 100 fg por célula). También existen otros factores que influyen en la señal emitida como son la especie, la fase de crecimiento de la célula, el estatus nutricional, el estrés o la edad celular. Por tanto, no es posible obtener un recuento directo de microorganismos en u.f.c. partiendo del valor de URL, resultando difícil su correlación. Además, la turbidez y color de la muestra puede afectar a la reacción incrementando o disminuyendo el nivel de luz emitida, y por tanto influyendo en la señal. La presencia de nucleótidos fosfatos (ADP, adenosín difosfato o GTP, guanosín trifosfato) también interfieren produciendo ATP en presencia de adenilato kinasa. Este compuesto es usado para incrementar la sensibilidad en el método. Este método ofrece ventajas en tiempo de obtención de resultados, sensibilidad y precisión [4]. Además, es un método muy empleado en las áreas de cosmética y farmacia, tanto para productos filtrables como no filtrables para determinar la presencia/ausencia de microorganismos en una cantidad de muestra [3].

Existen otros métodos como la **microcalorimetría** que se basa en la detección de calor procedente del catabolismo de los microorganismos. Requiere una cantidad mínima de microorganismos para obtener medidas fiables, la cual se alcanza por un período de enriquecimiento [8]. Esta técnica se ha utilizado básicamente en investigación y en la búsqueda de compuestos antimicrobianos.

Otro método empleado es la **turbidimetría** ya que el crecimiento de los microorganismos produce cambios en la opacidad del medio de

cultivo. Las medidas se realizan con un espectrofotómetro con un intervalo de longitud de onda de entre 420 - 615 nm. Un aspecto crítico de este método es que no distingue entre microorganismos viables y no viables [8, 19].

En la segunda categoría de métodos microbiológicos rápidos están los **métodos basados en la detección de viabilidad** que proporcionan medidas directas de microorganismos, donde éstos pueden ser cuantificados sin que sea necesario el crecimiento de los mismos. Entre estos métodos encontramos la citometría en fase sólida, la técnica de filtración epifluorescencia directa y la citometría de flujo [6, 19].

La **citometría en fase sólida** utiliza un filtro de membrana para retener los microorganismos procedentes de una muestra. Estos microorganismos son teñidos con un marcador fluorescente (fluoróforo) utilizado como un indicador de viabilidad. Para obtener buenos resultados con el marcador se requiere la integridad de la membrana celular, de manera que así el fluoróforo se retendrá dentro del citoplasma. El fluoróforo es inicialmente no fluorogénico y requiere la actividad enzimática intracelular para romper el substrato y emitir la fluorescencia. La excitación a través de un láser y el escaneo automático permite la detección de los microorganismos llegando incluso a niveles de detección de un único microorganismo. Un *software* apropiado permite distinguir entre microorganismos viables de las partículas autofluorescentes que puedan existir. Su alta sensibilidad y rapidez de detección permite la detección casi a tiempo real. Por tanto, este método permite no sólo la detección de microorganismos viables, sino que también detectará los viables pero no cultivables.

La técnica de **filtración de epifluorescencia directa**, puede ser considerada como la antecesora de la citometría en fase sólida. Los microorganismos de una muestra son concentrados por filtración y teñidos con un substrato fluorescente capaz de ser detectado por la iluminación epifluorescente. Esta técnica unida a la microscopía permite la rápida detección de microorganismos. La sensibilidad del método depende del volumen de producto filtrado y del número de campos examinados. La distribución de los microorganismos en la membrana afecta a la robustez del método.

Generalmente, estas dos técnicas se utilizan para muestras filtrables que contengan poca carga bacteriana, como por ejemplo el análisis de agua de fabricación en en ámbito farmacéutico.

La técnica de citometría de flujo será comentada más adelante y en más profundidad por ser ésta la utilizada en esta Tesis Doctoral.

La tercera categoría corresponde a los **métodos basados en el análisis de componentes celulares**, donde se encuentran los métodos inmunológicos, los basados en perfiles de ácidos grasos, los que utilizan la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier o la espectrometría de masas y los ensayos bioquímicos basados en reacciones fisiológicas.

Los **métodos inmunológicos** se basan en reacciones antígeno-anticuerpo y se emplean para detectar componentes celulares únicos de organismos específicos. Estas reacciones pueden estar unidas a fenómenos de aglutinación, con detección colorimétrica o fluorimétrica. Un claro ejemplo de ello es el *test* ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*). Sin embargo, hay que destacar un aspecto crítico de esta técnica y es que no necesariamente demuestra la presencia de microorganismos viables.

Otro de los métodos se realiza mediante **perfiles de ácidos grasos**, puesto que la composición de los ácidos grasos de los microorganismos es estable y muestra un elevado grado de homogeneidad con diferentes grupos taxonómicos. Los ácidos grasos de los microorganismos pasan por un proceso de saponificación, a continuación de metilación y extracción y son analizados por cromatografía de gases de alta resolución. La composición obtenida se compara con el perfil que más correlación tenga dentro de una base de datos para identificarlo. Esta técnica requiere un alto grado de estandarización.

La **espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier** es otra técnica utilizada para el análisis de microorganismos, puesto que se obtiene un patrón reconocible y estable de grupos taxonómicos de microorganismos. Los resultados son comparados con patrones de aislamientos conocidos y recogidos en una base de datos para poder identificarlos. Esta técnica requiere un alto grado de estandarización y además el análisis debe realizarse cuando las células se encuentran en el mismo ciclo de crecimiento para conseguir unos resultados fiables.

Otra técnica utilizada es la **espectrometría de masas**, en la cual los productos gaseosos originados al calentar microorganismos en vacío pueden analizarse para conseguir la identificación de los mismos. Similarmente ocurre cuando se utiliza la técnica MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight)* que emite un patrón distintivo de especies cargadas. Diferentes microorganismos generan diferentes patrones de peso molecular cargado o espectros que pueden ser utilizados para identificar organismos en género, especie y en algunos casos cepas. Tal espectro se puede comparar con perfiles conocidos y se utiliza como una manera rápida de identificación de células microbianas

intactas. Un aspecto crítico de esta técnica, es que requiere el cultivo de los aislamientos antes del análisis.

Por último, encontramos los **ensayos bioquímicos** que están basados en reacciones fisiológicas. Normalmente estos ensayos están precedidos por una tinción de Gram u otro *test* de diferenciación temprana para decidir el protocolo de análisis adecuado. Una vez elegido el *test* adecuado, las suspensiones microbianas son evaluadas por estos *kits* bioquímicos. Es sabido que los microorganismos experimentan reacciones particulares con distintas sustancias bioquímicas y por ello la identificación se realiza comparando el perfil de reacción bioquímica con una base de datos. Un aspecto crítico de este método es que para realizar el *test* se necesita una colonia pura y que además no tenga más de tres días. Estos métodos pueden ser realizados manualmente o mediante instrumentos automatizados. Su manejo es fácil, sin embargo la interpretación de los resultados puede ser subjetiva.

En la última categoría, se encuentran los **métodos basados en los ácidos nucleicos**. En referencia a estos métodos, existen técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos que se basan en la reiteración del proceso de polimerización del ácido desoxirribonucleico (ADN), guiando a un incremento exponencial de un fragmento específico de ácido nucleico para la identificación de microorganismos.

Un ejemplo es el uso de la técnica de PCR (*polymerase chain reaction)*. En este proceso cíclico termofílico, un fragmento específico de ADN es amplificado usando *primers* de oligonucleótidos. El ARN (ácido ribonucleico) también puede ser amplificado por PCR después de la transcripción de cADN (ácido desoxirribonucleico cíclico) usando transcriptasa reversa.

Esta técnica presenta muchas ventajas sobre los métodos clásicos para la detección de microorganismos tales como que son altamente específicos para un microorganismo particular o grupo de microorganismos, el procedimiento es rápido, evitando el problema de largos períodos de incubación y son altamente sensibles permitiendo idealmente la detección [6, 20].

Otro ejemplo es la técnica de *ribotyping/molecular typing* la cual caracteriza e identifica organismos usando fragmentos de ácidos nucleicos de genomas bacterianos. Estos fragmentos de ADN son hibridizados a un marcador de ARN ribosómico. Entonces se le aplica un sustrato quimioluminiscente y través de una cámara convierte los fragmentos de ADN luminicentes en información digital generando un perfil. Este perfil se compara con los patrones de bacterias conocidas recogidos en una base de datos. Estos patrones dan información taxonómica, incluso llegan a discriminar la especie [6].

II.2.3. Citometría de flujo con detección por fluorescencia

El término citometría de flujo se refiere a la medida de las características físicas o químicas de las células, otras muestras biológicas o microbolas cuando éstas fluyen en suspensión en el seno de un sistema hidrodinámico [21].

La citometría de flujo surge a principios del siglo XX, debido principalmente a la evolución conjunta de las técnicas de microscopía y de los avances en síntesis de reactivos fluorescentes.

La citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada para investigar bacterias en laboratorios de cultivo. Tiene su principal campo de aplicación en el ámbito clínico donde se ha desarrollado y se continúa utilizando, aplicándose a la separación de cromosomas, al estudio de poblaciones heterogéneas de bacterias, en el estudio de ciclos celulares en los tumores o en la diagnosis de enfermedades, a través del estudio de anormalidades en muestras biológicas. Además debido a la posibilidad existente de la adición de distintos componentes, se pueden realizar análisis multiparamétricos con múltiples láseres que permiten el uso de varios fluoróforos [22, 23, 24]. También, pero en menor medida se ha empleado en el ámbito de la monitorización medioambiental [25].

Hoy en día, tiene además aplicación en el área industrial, debido al hecho de que una de las ventajas del citómetro de flujo es que se puede aplicar a los análisis microbiológicos de materiales filtrables y no filtrables; encontrándose aplicaciones para el control de calidad de productos alimentarios como yogures y bebidas (zumos, leche) [24, 26 - 28] y para el control de productos cosméticos que es precisamente el ámbito de aplicación que se estudia en esta Tesis Doctoral.

El principio de medida del citómetro de flujo se basa en la detección de microorganismos (analitos) previamente marcados o derivatizados, cuando estos fluyen en suspensión mediante el principio de enfoque hidrodinámico, a través de una célula de flujo en el detector de fluorescencia tal y como se ilustra en la **Figura II.1.** [22, 23, 29].

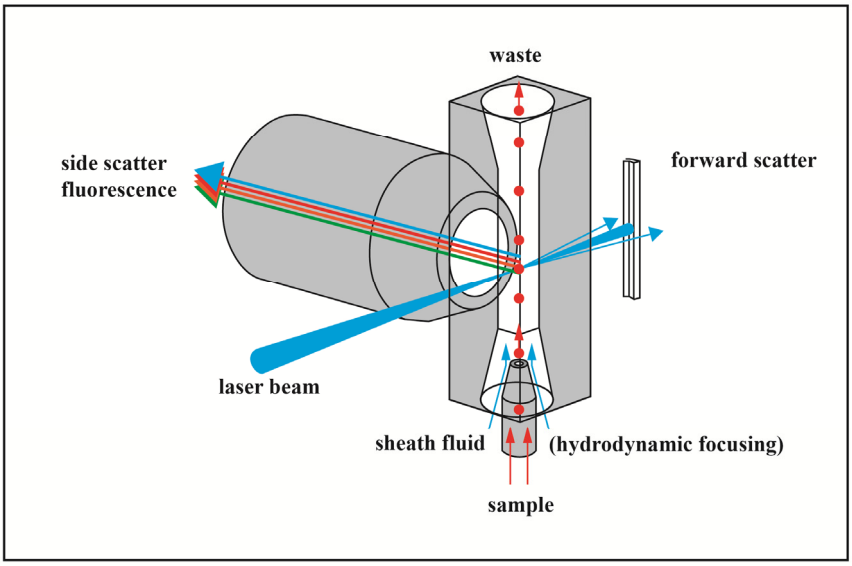

Figura II.1. Esquema de la detección por fluorescencia en citometría de flujo [29].

Existen distintos marcadores fluorescentes que se caracterizan por tener altos coeficientes de extinción, al igual que altos rendimientos cuánticos, aunque tienen la desventaja de ser dependientes del pH. Actúan introduciéndose fácilmente en células intactas que contengan esterasas, siendo éste el criterio de viabilidad [30].

El marcador de los microorganismos utilizado en la experimentación de esta Tesis Doctoral, es diacetato de carboxifluoresceína que es un substrato fluorogénico no fluorescente, sin carga y lipofílico que entra en

las células por difusión pasiva y actúa cuando existe actividad de la enzima esterasa, la cual está presente en todos los organismos vivos. Una vez dentro de células activas, los grupos acetato del substrato se hidrolizan/catalizan por medio de esterasas no específicas, dando un producto polar fluorescente (fluoresceína o sus derivados) [15, 31, 32]. Este marcador se utiliza conjuntamente con un compuesto denominado *counterstain* (contratinción) para evitar que las células muertas con membranas permeabilizadas, las cuales tienen un residuo de actividad esterasas, sean tomadas como una señal de una célula con una membrana intacta.

Existe una gran evidencia científica que apoya la capacidad de marcadores de viabilidad fluorescentes para detectar y/o contar un intervalo más amplio de microorganismos que el encontrado utilizando métodos estándar de recuento en placa [23, 24]. Su gran sensibilidad y rapidez de detección permite la detección de contaminantes microbianos casi a tiempo real. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la definición de viabilidad de las células es un concepto controvertido. Desde un punto de vista operacional con medios del cultivo, la viabilidad se demuestra mediante la habilidad de la división de las células. Sin embargo, en los métodos alternativos basados en marcadores fisiológicos, no se puede demostrar mediante la división celular, sino con la presencia de función activa, como la actividad de esterasas con el diacetato de carboxifluoresceína [33]. Por tanto, mediante estos métodos alternativos, los microorganismos metabólicamente activos, fastidiosos, viables pero no cultivables y esporas que han empezado a germinar se pueden detectar, sin que sea necesario que se repliquen, al contrario de lo que sucede con el método tradicional [8, 31].

Por otra parte, el citómetro de flujo está constituido por tres partes instrumentales claramente diferenciadas: una parte fluídica, otra óptica y una última electrónica.

La parte fluídica está compuesta principalmente por la célula de flujo y el puerto de transferencia de la muestra. La célula de flujo es la responsable de guiar las células al punto iluminado por el láser y todo ello pasando anteriormente por el puerto de transferencia de muestra. El líquido que llega a la célula de flujo está compuesto por la muestra biológica y un líquido que envuelve a ésta, denominado *sheath fluid* [29]. Este fluido envolvente, está constituido por una disolución tampón de fosfato (en el caso que nos ocupa de fórmula comercial confidencial) y presenta, principalmente, dos funciones. La primera de ellas es situar a la muestra biológica en el centro del flujo para dirigirla hacia el sistema de detección en régimen laminar, que evita que se mezcle con la muestra. La segunda función consiste en controlar que las células o partículas en suspensión se distribuyan individualmente en disposición lineal, todo ello basándose en el principio de enfoque hidrodinámico como se muestra en la **Figura II.1.** El fluido central que contiene la muestra biológica, se conoce como flujo coaxial.

Por su parte, la óptica instrumental se compone principalmente de una fuente de luz (que normalmente es un láser) que proporciona la luz de excitación que llega a la célula de flujo y los filtros de luz que separan y guían la fluorescencia emitida hacia los tubos fotomultiplicadores.

Cada uno de los microorganismos unicelulares marcados de la muestra que se encuentran suspendidos y atraviesan la célula de flujo de forma individual, son excitados por el láser y la fluorescencia emitida es recogida y medida a 90º. Aparte de esta señal lateral de fluorescencia, se

pueden recoger señales de dispersiones de luz (*scattering*) frontales, las cuales, dependiendo del método y marcador empleado, pueden indicar distintos parámetros como la granulidad de la célula, tamaño y morfología celular [22].

Debido a la excitación, las moléculas marcadas emiten su espectro de fluorescencia característico. Esta emisión de fluorescencia es dividida en dos intervalos de longitudes de onda por mediación de filtros ópticos (longitud de onda del verde 500 - 530 nm y longitud de onda del rojo 540 nm). A continuación, se determina la relación de fluorescencia entre ambas emisiones (rojo/verde) que se utiliza como parámetro discriminatorio contra partículas fluorescentes y células muertas permeabilizadas [31].

Por último, la parte electrónica del instrumento traduce la señal óptica recogida mediante un *software*, y la clasifica con los valores predeterminados para la obtención de la respuesta (positivo/dudoso/negativo), pudiendo visualizarlos en un histograma [22].

II.2.4. Referencias bibliográficas

[1] E. Iañez, Curso de Microbiología General *fai.unne.edu.ar/biologia/ microgeneral/micro-ianez/index.html*, 2005.

[2] A. I. Cuesta, Curso Acreditación de Laboratorios de Microbiología de Alimentos, FAO, 2008.

[3] Microbiología y conservación de cosméticos, Curso SEQC (Sociedad Española de Químicos Cosméticos), 2003.

[4] P. Newby, G. Dalmaso, S. Lonardi, B. Riley, P. Cooney y K. Tindall, The introduction of Qualitative Rapid Microbiological Methods for drug-product testing Pharmaceutical Technology, Process Analytical Technology (2004) 1- 6.

[5] Curso Guía de Prácticas de Microbiología, Facultad de Farmacia Universidad Complutense, 2005.

[6] Technical Report No. 33 Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 54 (2000) 3.

[7] <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods, USP 31–NF 26, 1 (2008) 681-683.

[8] 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality, European Pharmacopoeia 5.5 (2006) 4131- 4142.

[9] K. lemarchand, N. Parthuisot, P. Catala, P. Lerabon, Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bateria in water, Aquatic Microbial Ecology 25 (2001) 301-309.

[10] R.R. Colwell, Nonculturable but Still Viable and Potentially Pathogenic, Zbl.Bakt. 279 (1993) 154-156.

[11] H. M. Davey, A. Kaprelyants, D. Weichart, and D. B. kell, Approaches to the estimation of microbial viability using flow cytometry, Current Protocols in Cytometry, 2004.

[12] K.B. Amor, P. Breeuwer, P. Verbaarschot, F.M. Rombouts, A.D.L. Akkermans, W.M. De Vos, and T. Abee, Multiparametric Flow Cytometry and Cell Sorting for the assessment of Viable, Injured, and Dead Bifidobacterium Cells during Bile Salt Stress, Applied and Environmental Microbiology 68 (2002) 5209-5216.

[13] A.M. McKay, Viable but Nonculturable forms of potentially pathogenic bacteria in water, Letters in Applied microbiology 14 (1992) 129-135.

[14] J.D. Oliver, The viable but nonculturable state and cellular resuscitation, To Grow or Not to Grow: Nonculturability Revisited, Microbial Biosystems: New Frontiers, 1999.

[15] C. J. Bunthof and T. Abee, Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters, Applied and Environmental Microbiology 68 (2002) 2934–2942.

[16] Method Validation of U.S. Environmental protection Agency, Microbiological Methods of Analysis (2009) 2-9.

[17] Guidance for Industry Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products, FDA, 2008.

[18] D.J.S. Sutton, Compendial Requirements for Automated Microbiological Method Validation: The role of USP Ch 16 Automated methods of Analysis and the proposed, Ch 1058 Analytical instrument qualification PDA Letter • May, 2006.

[19] Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods, ISO/FDIS 16140: 2002.

[20] D.C. Singer, A. M. Cundell, The role of rapid microbiological methods within the process analytical technology Initiative, Pharmacopeial Forum 29 (2003) 6.

[21] H. M. Shapiro, Practical flow cytometry, Wiley-Liss, 2003.

[22] M. Salgado Lynn, Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), Curso de Métodos en Biotecnología, 2002.

[23] 2.7.24. Flow Cytometry, European Pharmacopoeia 5.6. (2006) 4423 – 4425.

[24] H. Davey, D. Kell, Flow Cytometry and Cell sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses, Microbiological Reviews (1996) 641-696.

[25] A. Pianetti, T. Falcioni, F. Bruscolini, L. Sabatini, E. Sisti and S. Papa, Determination of the Viability of *Aeromonas hydrophila* in Different Types of Water by Flow Cytometry, and Comparison with Classical Methods, Applied and Environmental Microbiology 71 (2005) 7948 – 7954.

[26] M. Brailsford, S. Gatley, Industrial Application of Flow Cytometry for the Rapid Detection of Microorganisms New Techniques in Food and Beverage Microbiology, Society for Applied Bacteriology (1993) 87 – 99.

[27] S. Flint, K. Walker, B. Waters and R. Crawford, Description and validation of a rapid (1h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders, Journal of Applied Microbiology 102 (2007) 909-915.

[28] C. Laplace-Builhé, K. hahne, W. Hunger, Y. Tirilly, J.L. Drocourt, Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries, Biol. Cell 78 (1993) 123-128.

[29] Manual técnico de D-Count, Chemunex, 2005.

[30] P. Breeuwer, J.L. Drocourt, N. Bunschoten, M. H. Zwietering, F.M. Rombouts, and T. Abee, Characterization of Uptake and Hydrolysis of Fluorescein Diacetate and Carboxyfluorescein Diacetate by Intracellular Esterases in *Saccharomyces Cerevisiae*, which Result in Accumulation of Fluorescent Product, Applied and Environmental Microbiology 61 (1995) 1614-1619.

[31] N. Parthuisot, P. Catala, K. Lemarchand, J. Baudart and P. Lebaron, Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters, Journal of Applied Microbiology 89 (2000) 370 – 380.

[32] R.I. Jepras, J. Carter, S.C. Pearson, F.E. Paul, and M.J. Wilkinson, Development of a Robust flow Cytometric Assey for determining Numbers of Viable Bacteria, Applied and Environmental Microbiology 61 (1995) 2696-2701.

[33] N. Parthuisot, P. Catala, P. Lebaron, D. Crermont and C. Bizet, A sensitive and rapid method to determine the viability of freeze-dried bacterial cells, Letters in Applied Microbiology 36 (2003) 412-417.

III. Validación de métodos analíticos cualitativos en el ámbito microbiológico

El principal objetivo de las ciencias químico-analíticas es solucionar problemas analíticos [1]. La solución a estos problemas se expresa a través de los resultados, los cuales deben poseer una determinada calidad analítica que cubra las necesidades demandadas por los clientes.

En los métodos de análisis, los indicadores que definen la calidad analítica son los **parámetros de calidad** o **características analíticas**. Estos atributos de los procesos de medida y resultados, deben ser evaluados en aras de obtener unos valores fiables [2]. El significado de fiable, en este caso, se refiere a que estos parámetros cumplan con los requerimientos que el método de análisis debe satisfacer. Por tanto, a la hora de emplear un método de análisis es primordial que, anteriormente a su utilización, se hayan evaluado los parámetros de calidad (proceso definido como calidad metrológica), pero siempre en concordancia con la información demandada por los clientes (proceso definido como calidad práctica). Este concepto es lo que se entiende por **validación** [1].

La validación es, consecuentemente, el enlace crucial entre ambas calidades mencionadas (metrológica y práctica), y además es una importante característica de cualquier método de medida porque está íntimamente relacionada con la calidad de los resultados, es decir, no puede asegurarse la calidad de los resultados obtenidos si el método no está previamente validado [3, 4]. Validar consiste en verificar y documentar la validez, la adecuación de unos requisitos previamente establecidos (características analíticas o parámetros de calidad), para asegurar el propósito perseguido o la adecuación a una finalidad, lo que corresponde al término en inglés "*fitness for purpose*".

La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define el término "*fitness for purpose*" como el grado al cual los datos

producidos por un proceso de medida, permiten al usuario tomar técnica y administrativamente decisiones correctas para la finalidad propuesta [3].

Otro de los organismos que recoge el término de validación es la ISO, (*International Organization for Standardization*), concretamente en el documento ISO 8402 "Gestión de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario", donde la validación se define como la confirmación, mediante el examen y la provisión de una evidencia objetiva, de que se han satisfecho unos requisitos particulares para un uso pretendido y específico [3, 4].

También se encuentra descrito en la ISO 17025 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", que describe la importancia de la validación de un método y su aplicación a un laboratorio analítico. La definición se asemeja a la encontrada en la ISO 8402 [5].

Éstos son solo algunos de los documentos bibliográficos de los muchos que recogen el concepto de validación y todos ellos muestran la importancia de realización de la validación antes de utilizar un método analítico. Sin embargo, no en todos los casos es necesario realizar una validación antes de su uso, sólo es imprescindible en los siguientes casos [1, 2, 4, 5]:

(i) Métodos que no proceden de un método oficial, como son por ejemplo aquellos métodos no publicados en las Farmacopeas, en el AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) u otras publicaciones oficiales.

(ii) Métodos nuevos diseñados en el propio laboratorio o por un proveedor o casa comercial.

(iii) Métodos estándares publicados por fuentes oficiales, pero que se utilizan con otra finalidad distinta a la descrita oficialmente.

En todos los casos, si existe un método de referencia previamente establecido, en la validación es necesario demostrar, al menos, la equivalencia entre los dos métodos, el nuevo y el estándar o de referencia[6].

Existe además un caso especial e intermedio de validación que se denomina transferencia de un método, en el cual no es necesario realizar el proceso de validación completa del mismo, sino que sólo se realizan aquellos puntos que se consideren más críticos dentro de la validación, para verificar que generan los mismos resultados fiables generados en la validación previa. La transferencia de un método puede darse en los siguientes casos:

(i) Estándares publicados por fuentes oficiales a los cuales se aplican pequeñas modificaciones [2, 5].

(ii) Incorporación de mejoras en el método, en las que sólo habrá que validar aquellos puntos o parámetros a los que afecte la mejora.

(iii) Utilización del método en diferentes laboratorios para generar resultados comparables a los del laboratorio emisor.

(iv) Utilización del método en un equipo diferente al que se ha realizado la validación.

En referencia a quién realiza la validación, existen varias maneras de llevarla a cabo. La primera de ellas es internamente en el laboratorio y, por tanto, es el propio laboratorio que va a aplicar el método quien realiza la validación. Otra manera, es mediante estudios de colaboración entre

varios laboratorios [5], los cuales evalúan una o varias propiedades de la muestra. Sin embargo, es fundamental que los laboratorios que participan en estos estudios sean evaluados previamente a la realización de esta validación y obtener buenos resultados, para garantizar que sus resultados tienen alta fiabilidad en el proceso de validación. Como punto de partida para la realización de estos estudios interlaboratorios, se tienen las guías ISO o el IUPAC *Technical report,* donde se definen los términos necesarios, el número de laboratorios participantes, las muestras analizadas, cómo deben ser analizadas estas muestras y el tratamiento de datos a realizar. Pero los estudios interlaboratorios no son fáciles de llevar a cabo, puesto que se necesita encontrar suficientes laboratorios en los cuales se haya demostrado su fiabilidad en la obtención de resultados y además la inversión económica para su realización es elevada. La última opción es la validación con un tercer laboratorio, donde el laboratorio que verifica los parámetros del método, pertenece a una institución o tiene la competencia para evaluar la calidad de otros laboratorios. Un ejemplo de ello es el *Peer Verified Methods,* programa perteneciente a la AOAC [3].

Una vez definido quien realiza la validación, el siguiente paso es la definición de cómo se realiza una validación. Es clave saber que no existe un único modo o proceso de llevar a cabo una validación, puesto que, por definición, para cada método será necesario definir unos parámetros y requerimientos dependiendo del uso o propósito de análisis [1,3]. Lo que sí puede definirse es una estrategia general de validación que pueda aplicarse a la hora de comenzar con una validación. El proceso general de validación consistiría en los siguientes pasos [4]:

(i) Definición del uso previsto

(ii) Concreción de los requisitos, es decir, las características o parámetros analíticos a cumplir dependiendo del propósito de análisis definido anteriormente. En el establecimiento de estas características hay que tener en cuenta una serie de puntos clave como puede ser si el método es cuantitativo o cualitativo, puesto que dependiendo de si es uno u otro, los parámetros son distintos y la evaluación a efectuar, por tanto, también lo es. Además de esto, hay que tener en cuenta la disciplina científica en la que está inmersa, puesto que los parámetros a aplicar también serán distintos dependiendo de si está en el ámbito de la química, la microbiología… Por último, es importante considerar el área de aplicación específica (farmacéutica, cosmética, medioambiental, alimentación...) y los niveles de rigor requeridos en cada una de ellas.

(iii) Realización del proceso experimental de determinación de las características analíticas definidas. Además, si existe un método de referencia, realizar la comparación con éste. En esta comparación los resultados deben ser igual o de calidad superior a los obtenidos por el método de referencia.

(iv) Comparación entre las informaciones definidas al comenzar la validación y los resultados obtenidos de la experimentación.

(v) Toma de decisión sobre si el método finalmente está validado o no, dependiendo de si los resultados se adecuan a lo definido inicialmente. Si el resultado es negativo, entonces es necesario reestructurar el proceso y proceder de nuevo a realizar la validación, siempre que sea posible.

III.1. Métodos cualitativos

Al revisar la bibliografía en materia de validación de métodos analíticos, se observa que la gran mayoría de los estudios están orientados a la validación de los métodos cuantitativos. Sin embargo, los métodos cuantitativos no son siempre los más adecuados para cubrir las necesidades del cliente. Los laboratorios y sobre todo los de rutina, deben reconsiderar si los resultados obtenidos por los métodos cuantitativos empleados, son realmente necesarios para la información demandada por el cliente, como puede ser cumplir con una legislación. Muchas veces, los clientes están más interesados en saber si la muestra cumple o no con la legislación o normas establecidas, que en dar un resultado cuantitativo de concentración exacta.

En los últimos años, precisamente en contraposición a la extracción de la máxima información lograda con los métodos cuantitativos, ha aparecido una tendencia hacia la simplificación de la información obtenida, para así evitar un exceso de información que en algunas ocasiones resulta innecesaria [1]. Esta simplificación de información va unida, en la mayoría de los casos, a características como la rapidez de los resultados y reducción de coste, características muy importantes demandadas hoy en día por los clientes. Es por ello, que está habiendo un desarrollo e implantación de sistemas que aporten rapidez y fiabilidad en los resultados para solucionar una amplia variedad de problemas, sin que sea necesario para ello cuantificar el valor exacto de un determinado parámetro analítico [7].

Para estos casos, lo más adecuado es la utilización de los **métodos cualitativos**. Debido al incremento en la utilización de estos métodos y el

poco protagonismo que han tenido hasta el momento, resulta necesario revisarlos y caracterizarlos práctica y metrológicamente [1].

Se entiende por método cualitativo, el método de análisis cuya repuesta se basa en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra [4, 8].

Los métodos cualitativos se pueden clasificar (atendiendo al sistema de detección utilizado) en dos grandes grupos, el análisis cualitativo sensorial e instrumental.

El análisis cualitativo sensorial se realiza en base a los sentidos humanos. El sentido más empleado en este tipo de análisis es la vista, puesto que la mayoría de los sistemas se basan en la aparición o no, de un determinado color como resultado de una reacción química o bioquímica. La respuesta de este tipo de sistemas se obtiene normalmente de forma directa, sin ningún tratamiento de datos. Mientras que el análisis cualitativo instrumental realiza la detección en base a una medida instrumental. La respuesta instrumental de este tipo de sistemas de medida, debe transformarse en respuesta binaria (SI/NO) por lo que implica normalmente un tratamiento de datos. Aunque los métodos clasificados dentro de esta categoría son básicamente cuantitativos, son utilizados de una manera cualitativa. Generalmente, la decisión final se hace comparando la respuesta de la muestra con la respuesta que contiene el analito de interés al límite de especificación o especificado anteriormente en un estudio previo [4,7].

Se distinguen también dos tipos de análisis cualitativos de acuerdo a la información analítica requerida.

Por una parte, están los análisis de **identificación** de analitos o grupos de analitos utilizando técnicas de separación (como cromatografía de gases, líquidos y electroforesis capilar) y técnicas de detección (como son espectrometría de masas o la técnica de infrarrojos con transformada de Fourier) [1, 9]. Dentro del ámbito de la microbiología estos métodos se utilizan para identificar las especies de microorganismos. Entre las técnicas más empleadas se encuentra por ejemplo la técnica de PCR [10].

Por otra parte, se encuentran los análisis de **clasificación** de muestras. Estos métodos cualitativos se denominan habitualmente también sistemas de *screening* o de cribado, y en ellos se obtiene una respuesta binaria SI/NO y, por tanto, clasifican las muestras en positivas y negativas con arreglo a la presencia/ausencia de analito/s en una muestra. Como puede desprenderse de los sistemas de *screening*, la presencia o ausencia de un determinado analito en la muestra, está relacionado con un nivel específico de concentración y responde a distintas situaciones en función de la respuesta obtenida:

(i) Presencia/Ausencia de un determinado analito en un volumen de muestra.

(ii) Presencia/Ausencia de un determinado analito en un volumen de muestra por encima de un límite, es decir, por encima de un determinado nivel de concentración que, habitualmente, viene fijado por la legislación o por el cliente [4].

Esta Tesis Doctoral se focalizará en el análisis de clasificación de muestras cosméticas en base a la detección de microorganismos en las mismas.

El principal interés en los sistemas de clasificación de muestras o *sample screening*, radica en que se utilizan como una **etapa previa** de cribado de las muestras, de manera que así se evita, que todas las muestras sean sometidas a todo el proceso de medida. Sólo se realizará todo el proceso analítico en aquellas muestras en las cuales se obtenga un resultado positivo, obteniéndose una mayor rapidez en la obtención de resultados, y por tanto, una reducción importante de tiempo y coste de los análisis. Dentro del ámbito empresarial esto supone, aparte de las ventajas mencionadas anteriormente, también una reducción del tiempo de estocaje de los productos fabricados, lo que se traduce en una reducción de coste, vital para el sector industrial.

En el proceso de análisis de muestras utilizando los sistemas de *screening*, como primer paso, se determina la presencia o ausencia de uno o más analitos en la muestra. Si la muestra contiene el analito (respuesta positiva, SI), la muestra pasará a un segundo paso, que es la confirmación de la presencia del analito con el método adecuado (método de referencia o comparativo). Sin embargo, las muestras en las que se obtengan resultados negativos en el sistema de clasificación inicial (NO), no contendrán el analito buscado y por tanto, no se continuará investigando en ellas [4].

Los métodos cualitativos de *screening* tienen una de las mayores aplicaciones en los laboratorios de rutina o control de calidad de distintas áreas y disciplinas, por la necesidad principalmente, de la obtención de resultados más rápidos, lo cual conlleva una reducción de coste asociado. La filosofía analítica de los métodos de cribado adaptada a los métodos microbiológicos se ilustra en la **Figura III.1.**

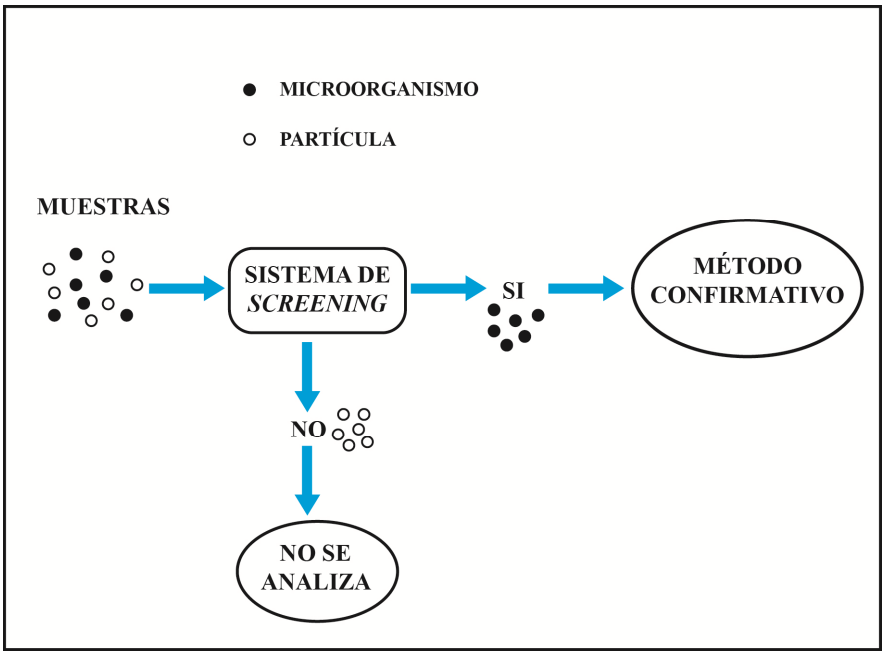

Figura III.1. Sistema de cribado o *screening* para análisis de muestras microbiológicas (adaptado de referencia 4).

Sin embargo, estos métodos cualitativos están llenos de connotaciones cuantitativas. En efecto y dentro del ámbito del análisis cualitativo, para producir una respuesta binaria, en primer lugar resulta preciso establecer varias referencias cuantitativas [1]. Entre ellas cabe destacar el límite de detección, que es una característica crucial del método en el análisis cualitativo, porque establece la barrera entre las zonas de no-detección y detección. Otra referencia importante es el límite de especificación, que es designada por la legislación o por los clientes, cuyo término en inglés corresponde a *threshold limit*. Por último, el límite de corte que, normalmente, es establecido por el laboratorio, para asegurar la respuesta dada ante los clientes. Este límite está situado entre los dos definidos anteriormente.

Además, para producir una respuesta binaria fiable, se han de comparar las señales producidas por una muestra o analito estándar y las señales generadas por los blancos y controles negativos de las muestras [6].

El punto débil más relevante en este contexto, es la existencia limitada de materiales de referencia certificados (CRM) y de blancos apropiados en relación a los numerosos campos de aplicación [1]. Si se considera la aplicabilidad de los métodos cualitativos y la importancia de las áreas en las cuales se usan, la validación de los métodos cualitativos de análisis resulta fundamental para la calidad de los resultados finales [3].

III.2. Validación de métodos cualitativos

Como se ha comentado anteriormente, la validación de un método coincide con el proceso de definir unos requerimientos analíticos y confirmar que el método tiene la habilidad de realizar la aplicación que se requiere de una manera consistente [6]. Por tanto, todos los métodos se deben validar para demostrar su capacidad analítica [11].

Sin embargo, la validación de los métodos cualitativos no está tan desarrollada como la de los métodos cuantitativos. En efecto, si se revisa con detenimiento la bibliografía de los últimos 50 años sobre los parámetros de calidad, se observa que casi todos los documentos se refieren a las características analíticas cuantitativas, donde se caracterizan sus resultados y los métodos correspondientes. Sólo alguno de los documentos, caracterizan las respuestas binarias (SI/NO) características de los métodos cualitativos [1].

Además, en referencia directa a los parámetros de calidad de los métodos cualitativos, se percibe que no son fáciles en su definición y aplicación debido a la **falta de estandarización** existente, convirtiendo así la validación en una tarea nada sencilla.

Es preciso indicar que, en primer lugar, existe una falta de definición y estandarización en cuáles son los parámetros que definen los métodos cualitativos, ya que éstos varían dependiendo de la bibliografía que se consulte. En segundo lugar, nos encontramos también una falta de estandarización dentro de la definición de algunos parámetros, ya que un parámetro puede tener variaciones o diferentes acepciones en su definición. Estos hechos están influidos fundamentalmente por tres aspectos reveladores:

(i) Las **peculiaridades intrínsecas de los métodos cualitativos** que hace que no todos los parámetros utilizados en el entorno de la validación de los métodos cuantitativos sean extrapolables a los métodos cualitativos y sea necesaria su adaptación [1]. A continuación se indican algunos aspectos. En efecto, algunos parámetros cuantitativos directamente no se aplican o no tienen existencia en los métodos cualitativos, como por ejemplo la exactitud o la precisión. Otros parámetros deben ser adaptados, ya que su definición cuantitativa no se corresponde totalmente con el parámetro de calidad en el ámbito cualitativo. Un ejemplo es el concepto de incertidumbre, el cual se adapta y se define en los métodos cualitativos como no-fiabilidad. También existen parámetros, por el contrario, que mantienen su nomenclatura, pero que en los métodos cualitativos cambian su significado dependiendo del ámbito de trabajo, por lo que pueden crear cierta confusión, tales como son la sensibilidad y la especificidad. Por último, cabe resaltar que algunos parámetros son específicos solamente del análisis cualitativo, como son los falsos resultados.

(ii) Las características inherentes de la **disciplina científica** a la que se aplique, debido principalmente a las grandes diferencias existentes entre ellas, como son, por ejemplo, las existentes entre la química y la microbiología. En consecuencia, los parámetros de calidad han de adaptarse una segunda vez.

En el caso que nos ocupa dentro del ámbito de investigación de esta Tesis Doctoral, los parámetros analíticos han de adaptarse al análisis microbiológico, cuyos ensayos, al trabajar con microorganismos, presentan unas peculiaridades inherentes. Por ejemplo, destacar la

variabilidad de resultados obtenidos a bajas concentraciones de microorganismos. En efecto, el análisis microbiológico tradicional en placa presenta un amplio intervalo de variabilidad, desviación estándar relativa (RSDs) del 15-35 %, sin embargo en los ensayos químicos las RSDs obtenidas son en general inferiores al 5 % [12, 13].

(iii) Las exigencias de calidad o control demandadas en los diferentes **ámbitos del análisis o áreas de trabajo,** como puede ser el farmacéutico, bioanalítico, medio ambiental, cosmético o alimentario entre otros, que tienen diferentes connotaciones debido a las exigencias en la mayoría legales y la idiosincrasia de los productos [1, 4, 9].

Todos estos factores, hacen que exista una gran variabilidad dentro de los parámetros para definirlos y aplicarlos a la hora de llevar a cabo una validación. A toda esta falta de estandarización, además hay que añadir y recordar, que no existe una única aproximación o único protocolo de validación recomendado [1], sino que es necesario, para cada método, definir y aplicar los parámetros adecuados y acordes con la finalidad perseguida. La bibliografía, lo que sí señala, es que cuando sea posible, la comparación con un método de referencia es la mejor opción en una validación. En el caso que nos ocupa, los análisis en el estudio de validación, deben realizarse con ambos métodos. Por tanto, para los métodos alternativos y los métodos tradicionales de siembra en placa, la validación debe ir unida a la demostración de equivalencia o mejora de resultados, con respecto al método de referencia [13, 14]. Asimismo, resulta crítico identificar la parte del análisis que supone la aproximación analítica de *screening*, dentro de todo el proceso de medida, ya que por lo general el método alternativo, no sustituye a todo el proceso de medida [12].

III.3. Parámetros analíticos de los métodos cualitativos

La validación implica, para cada problema analítico concreto y como paso previo, la definición de los parámetros de calidad adecuados y, seguidamente, la determinación para el uso que se pretende.

Sin embargo, según se ha comentado anteriormente en esta Tesis Doctoral, en los parámetros de calidad de los métodos cualitativos, existe falta de estandarización, que influye de manera significativa en el proceso de validación. Por tanto, a continuación, se va a realizar una propuesta de definición de las características analíticas de los métodos cualitativos en el ámbito de la microbiología, partiendo de las que se han encontrado mayoritariamente en la bibliografía. Cabe destacar que, en el proceso de validación de un método cualitativo, no todos los parámetros de calidad han de ser necesariamente evaluados e incorporados en la validación, dependerá de la información necesaria, propósito perseguido y el área de aplicación.

Las **características analíticas principales** de los métodos cualitativos que podemos incluir en un proceso de validación son: falsos resultados, fiabilidad, no-fiabilidad, trazabilidad, sensibilidad, límite de detección, especificidad, propiedades relacionadas con la productividad (tiempo de análisis, coste y riesgo), representatividad y robustez [1].

El conjunto de **falsos resultados** es una de las características analíticas más importantes de los métodos cualitativos a la hora de realizar una validación, constituyendo la base para la obtención de otros parámetros de calidad. Los falsos resultados se componen de los **falsos positivos (FP)** y los **falsos negativos (FN).** Estos parámetros no tienen

equivalencia con ningún parámetro de calidad de los que componen los métodos cuantitativos, son exclusivos de los métodos cualitativos [9].

Se denomina **FP** al resultado positivo obtenido por el método alternativo (objeto de validación) pero que se confirma como resultado negativo por el método de referencia o tradicional y se denomina **FN** al resultado negativo obtenido por el citado método alternativo, pero que se confirma como resultado positivo por el método de referencia o tradicional.

En términos de probabilidad, ambos tipos de resultados se definen y calculan como se recoge a continuación:

- FP(%) = [FP / (VN + FP)] x 100
- FN (%) = [FN / (VP + FN)] x 100

donde FP = falsos positivos; FN = falsos negativos; VP = verdaderos positivos; VN = verdaderos negativos

Estos FP y FN, que como se ha indicado anteriormente, parten de la comparación entre el método que queremos validar o alternativo y el método utilizado como referencia o tradicional, se recogen normalmente en una tabla de contingencia como se indica, a modo de ejemplo, en la **Tabla III.1.** Además de los FP y FN, la tabla de contingencia recoge los verdaderos positivos y los verdaderos negativos. Se denomina **verdadero positivo (VP)**, al resultado positivo obtenido por ambos métodos (alternativo y referencia) y **verdadero negativo (VN)** al resultado negativo obtenido por ambos métodos al compararlos.

Tabla III.1. Tabla de contingencia correspondiente a la comparación entre el método alternativo y el método de referencia [15].

Tipo de respuestas		**Método de referencia**	
		Positivas	**Negativas**
Método alternativo	**Positivas**	VP (+/+)	FP (+/–)
	Negativas	FN (– /+)	VN (– /–)

VP = Verdadero positivo, VN = Verdadero negativo, FP = Falso positivo y FN = Falso negativo

Dentro de los falsos resultados, la obtención de FP no es tan crítica como la de FN, puesto que para la muestra en la cual se obtiene un FP (positivo en el método alternativo/negativo en el método tradicional), el proceso de medida continúa y esta es confirmada por el método tradicional. Sin embargo, si en el análisis de una muestra se obtiene un FN (negativo alternativo/positivo tradicional), este resultado no se evaluará posteriormente, puesto que será considerada una muestra correcta. Las consecuencias de aceptar resultados negativos cuando son realmente positivos, pueden resultar nefastas para la seguridad y salud del consumidor, así como para la imagen y futuro del propio laboratorio. Por tanto, la determinación de FN es crítica [1] dentro de una validación, ya que se descifrará la capacidad analítica del método en este aspecto.

A partir del cálculo de FP y FN, se pueden determinar otra serie de parámetros como son la fiabilidad y no-fiabilidad, así como la sensibilidad y la especificidad.

La **fiabilidad** es una característica analítica propia de las respuestas binarias SI/NO, y traducido al ámbito cuantitativo, se puede considerar como una combinación de la exactitud y la precisión, características que no pueden usarse adecuadamente en el análisis cualitativo [1]. La fiabilidad significa asegurar consistencia entre la información química proporcionada por el laboratorio, con la requerida por el cliente[7].Expresada de forma matemática, la fiabilidad se define como el porcentaje de respuestas correctas SI/NO obtenidas con alícuotas de una misma muestra e implica el cálculo previo de falsos resultados acorde a la siguiente ecuación:

- Fiabilidad (%) = 100 % – % FP – % FN

Por tanto, la fiabilidad es una característica analítica positiva que abarca connotaciones negativas, es decir, los errores del análisis cualitativo (FP y FN).

Los resultados de los sistemas de cribado, están normalmente sujetos a un método confirmativo solo cuando la respuesta binaria es positiva. Por tanto, dentro de la definición matemática, como se ha comentado anteriormente, la importancia de los FN es muy importante. Hay que enfatizar que la fiabilidad será mayor, cuanto mayor sea el número de alícuotas y niveles de concentración estudiados del analito. Este parámetro depende en gran medida de la concentración del analito [1]. Por lo general, en la concentración correspondiente al límite de corte (la cual hay que establecer previamente) es donde aparecerán los falsos resultados y, por tanto, donde la fiabilidad disminuirá.

Por otra parte, y como es bien conocido, existe una propiedad analítica crucial de los resultados cuantitativos que no puede ser aplicada

directamente a los análisis cualitativos: la incertidumbre. La característica analítica equivalente a la incertidumbre en el contexto de la validación de los métodos cualitativos es la **no-fiabilidad**. La no-fiabilidad es complementaria a la fiabilidad e incluye los errores en los análisis cualitativos (FP y FN). Al igual que la fiabilidad, lógicamente depende en gran medida de la concentración del analito y del número de alícuotas analizadas. La diferencia entre la no-fiabilidad de los métodos cualitativos y la incertidumbre de los métodos cuantitativos es que la primera, informa sobre dónde se producen los errores, mientras que la segunda da información sobre dónde se esperan los resultados [4]. Lo que sí es común a ambos intervalos es que deben ser lo más bajos posible.

La interpretación gráfica de la fiabilidad y la no-fiabilidad se muestra en la **Figura III.2.** En primer lugar se identifica una zona donde se obtiene siempre una respuesta negativa (zona de VN) y otra donde se obtiene siempre una respuesta positiva (zona de VP). En ambas la fiabilidad es máxima. Sin embargo, existe otra zona de no fiabilidad donde se pueden obtener tanto respuestas positivas como negativas y que se corresponde con la zona de falsos resultados (positivos y negativos).

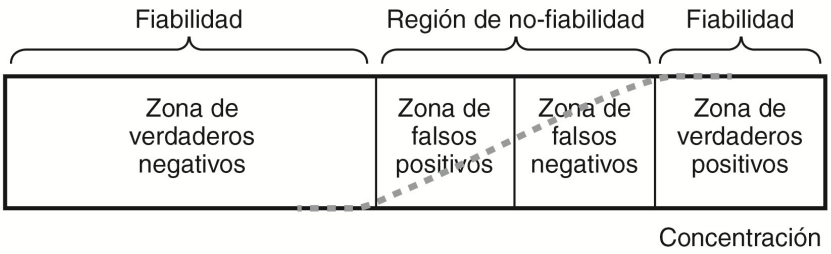

Figura III.2. Zonas de fiabilidad y no-fiabilidad (adaptado de referencia 4).

La **trazabilidad**, por definición, necesita comparar los resultados obtenidos con una referencia final. Si no hay comparación de los resultados del método alternativo con una referencia, no pueden determinarse los principales parámetros de calidad. Existen tres tipos de referencias con las cuales se pueden comparar los resultados de un método alternativo:

(i) El primer tipo es un material de referencia certificado, que se realiza comparando los resultados del método alternativo con alícuotas de un CRM, es decir, con el valor certificado. El talón de Aquiles a esta forma de trazabilidad, es la escasa disponibilidad de CRMs a diferentes niveles de concentración del analito y en diferentes áreas de aplicación de los métodos cualitativos.

(ii) El segundo tipo de referencia consiste en comparar el *test* cualitativo con los resultados de un método de calidad metrológica superior. La secuencia de la cadena metrológica es: *test* cualitativo – método confirmativo – método de referencia – método primario, siendo este último el que implica la máxima categoría metrológica. En la mayoría de los métodos, la comparación con el método confirmativo es suficiente. Esta evaluación analítica de la trazabilidad utilizando la comparación con un método de calidad superior se corresponde, en el ámbito de los métodos cualitativos y del análisis microbiológico, al ***test* de equivalencia**, en el cual, los resultados por el método alternativo tienen que ser equivalentes o mejores a los obtenidos en el método de referencia.

(iii) La última referencia, es mediante ejercicios interlaboratorios, en los cuales varios laboratorios realizan el mismo ejercicio,

comparando los valores obtenidos entre los distintos laboratorios que forman parte de este grupo [1, 2, 7].

La **sensibilidad** analítica de los métodos cualitativos en el ámbito de la microbiología se relaciona directamente con la fiabilidad del método. En este ámbito, la sensibilidad se define como la habilidad del método para detectar muestras positivas cuando verdaderamente son positivas [1, 9]. Esta característica está relacionada consecuentemente, con los falsos negativos y matemáticamente se expresa acorde a la siguiente ecuación:

- Sensibilidad = VP/ (VP + FN) =1 – FN (al 95% de probabilidad)

El único parámetro capaz de expresar sensibilidad matemáticamente, es el **límite de detección** que constituye una referencia crucial en el análisis cualitativo, porque establece la barrera entre las zonas de no detección y detección [1], por lo que este parámetro se describe como un parámetro separado de la sensibilidad.

Aplicado al ámbito de la microbiología, el límite de detección corresponde al número más pequeño de microorganismos que puede detectarse en una muestra, bajo una serie de condiciones experimentales establecidas [12]. Debido a la naturaleza de la microbiología (su capacidad de crecer, multiplicarse…), el límite de detección se refiere al número de microorganismos *presente en la muestra antes de realizar ninguna dilución o incubación* en el proceso de análisis y, en consecuencia, no se refiere al número de microorganismos presentes en el momento del análisis (siembra en placa, análisis instrumental…) [10, 12, 17, 18]. La determinación de este parámetro se realiza inoculando microorganismos viables en las muestras a diferentes concentraciones, confirmándose los resultados de la inoculación mediante los métodos tradicionales en placa,

es decir, el método tradicional de referencia utilizado. Generalmente, el número establecido de microorganismos a inocular para estos estudios, ha de ser mayor de 10 u.f.c y menor de 100 u.f.c. [14], para evitar excesiva variabilidad en los resultados y poder obtener un buen recuento en placa.

El criterio más utilizado para establecer el límite de detección en métodos cualitativos microbiológicos, es la detección del número de microorganismos cultivables más pequeño que pueda detectarse en una muestra en el 50% de ocasiones, tanto por el método alternativo que quiere validarse, como por el método de referencia [9, 10, 12, 15, 17, 19]. Este porcentaje es tan alto porque a concentraciones muy bajas, (de máximo interés para la determinación del límite de detección), la recuperación de los microorganismos, es muy incierta, estadísticamente hablando. A bajos inóculos de microorganismos se produce recuperación fraccionada, es decir, en unas muestras se produce verdadera inoculación, y en otras no [8]. Por ejemplo, si intentamos inocular menos de 2 microorganismos en la muestra, obtendremos un amplio porcentaje de verdaderos negativos, es decir, en muchas de ellas no se habrá producido inoculación y solo en alguna de ellas sí. El porcentaje de no inoculación es aleatoria y puede ir desde <10 a 100 % como define la distribución de Poisson [19, 20].

La **especificidad** en el ámbito de los análisis cualitativos en microbiología, se define como la habilidad de un método para detectar muestras negativas cuando verdaderamente son negativas. Está directamente relacionada con los FP tal y como recoge la ecuación que permite su cálculo:

- Especificidad = VN/ (VN + FP) = 1 – FP (al 95% de probabilidad)

Las características analíticas **relacionadas con la productividad** son el tiempo de análisis, el coste y riesgo que supone implantar un método alternativo para que sea rentable a nivel industrial. Por tanto, estos parámetros tienen gran importancia a nivel práctico. Los métodos cualitativos de *screening* hacen que estas características se mejoren con respecto a la utilización de los métodos convencionales, ya que estos parámetros disminuyen con el empleo de estos métodos.

Sin embargo estos parámetros son sólo considerados ocasionalmente en estudios de validación, ya que se alejan de la metrología convencional[1]. Además, son excluidos puesto que pueden causar limitaciones en la utilización de algunos métodos alternativos que supongan un elevado aumento de alguno de estos parámetros o la combinación entre ellos.

La **representatividad** es una característica esencial y base de cualquier análisis o validación, ya que la muestra debe ser representativa del material de la que fue tomada y, en consecuencia, del problema analítico. El aseguramiento de la representatividad pasa por el empleo de estrategias apropiadas de muestreo y la correcta implantación de un protocolo de muestras [1, 5].

La **robustez** es la capacidad del método de permanecer inalterado ante pequeños cambios deliberados en los parámetros del método. Ejemplos de cambios deliberados en distintos parámetros pueden ser: cambios en la concentración de un reactivo o en las condiciones de incubación (tiempo, temperatura, pH…) [1, 12, 14]. Por tanto, describe la resistencia de la propiedad a cambiar la respuesta binaria, cuando se le aplican diferentes condiciones experimentales a alícuotas de la muestra a analizar. El objetivo es identificar qué variables son críticas para asegurar la fiabilidad de la respuesta. Esta resistencia depende fuertemente de la

concentración del mesurando [1], es decir, si el experimento se realiza a concentraciones cercanas al límite de corte o especificación, o cercanas a la obtención de la zona de falsos resultados, la influencia de los factores experimentales es mayor y como resultado la robustez disminuye.

La determinación de este parámetro también es importante si se utiliza el método en distintos laboratorios, puesto que hay que evaluar la influencia de las distintas condiciones experimentales.

III.4. Evaluación de los parámetros de calidad de los métodos cualitativos de cribado de muestras

Todos estos parámetros de los métodos cualitativos definidos hasta ahora, pueden evaluarse con distintas herramientas. Algunas de las herramientas que permiten caracterizar y expresar los resultados de un sistema de *screening* o cribado, son las tablas de contingencia y las curvas características de funcionamiento.

Las **tablas de contingencia** dan una visión general de cómo actúa el método cualitativo, sin embargo, no dan información individual. Con ellas se calculan los falsos resultados y por tanto, a partir de aquí pueden calcularse otra serie de parámetros como la fiabilidad, la sensibilidad y la especificidad del método [4]. Una desventaja de esta forma de evaluar los resultados, es que la capacidad de las tablas de contingencia depende del número total de muestras analizadas, cuantas más muestras analizadas, más fiable es la evaluación de los resultados. Además, a esto hay que sumarle que las muestras deben ser analizadas por ambos métodos, alternativo y de referencia, lo que supone un aumento de la carga de trabajo a la hora de realizar la validación. La **Tabla III.1** comentada anteriormente, se corresponde con un ejemplo de tabla de contingencia.

Otra forma de evaluar los resultados es a través de las **curvas características de funcionamiento,** que consisten en representar la probabilidad de obtener resultados positivos a distintos niveles de concentración del analito. El resultado es una curva sigmoidal, cuya pendiente y amplitud es particular para cada método cualitativo. La principal ventaja es que proporciona una cantidad importante de información analítica: FP, FN, sensibilidad, especificidad y otras características como el límite de detección, el límite de corte y la región

de no-fiabilidad. Todo ello a partir del cálculo de probabilidades de positivos, negativos y dudosos encontrados en los resultados.

La principal desventaja de este sistema de evaluación, al igual que para las tablas de contingencia, es la necesidad de realizar numerosos análisis para cada nivel de concentración [4]. A continuación, en la **Figura III.3** se ilustra un ejemplo de curva característica, que muestra las características analíticas mencionadas anteriormente.

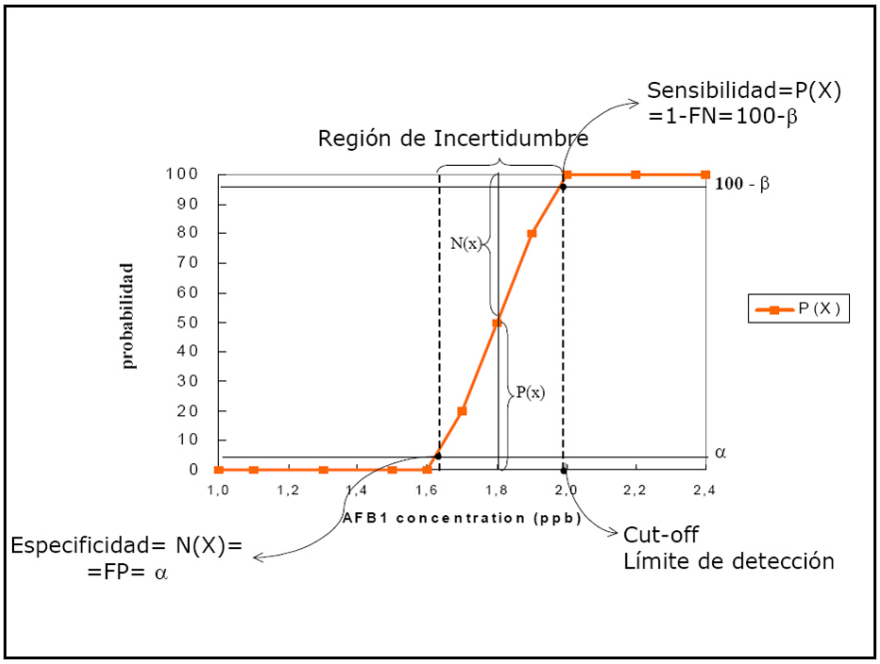

Figura III.3. Curva característica de funcionamiento para el cribado de muestras que contienen aflatoxinas B1 [3].

III.5. Referencias bibliográficas

[1] S. Cárdenas, M. Valcarcel, Analytical features in qualitative analysis, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 477- 487.

[2] A. Ríos, Curso Validación en laboratorios de análisis químicos, 2009.

[3] E. Trullols, Validation of qualitative analytical methods, Tesis doctoral Universitat Rovira i Virgili, 2006.

[4] E. Trullols, I. Ruisánchez, F. X. Rius, Validation of qualitative analytical methods, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 137 – 145.

[5] Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005.

[6] Fitness for purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv, 2014.

[7] A. Ríos, H. Téllez, Reliability of binary analytical responses, Trends Anal. Chem. 24 (2006) 609-616.

[8] P. Feldsine et al., AOAC INTERNATIONAL Methods Commettee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis, Journal of AOAC International 85 (2002) 1187- 1199.

[9] S.L.R. Ellison, T. Fearn, Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 468- 476.

[10] Technical Report No. 33 Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 54 (2000) 3.

[11] J. Esteban, Curso Aspectos aplicados de la sistemática de validación, 2008.

[12] <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods, USP 31–NF 26, 1(2008) 681-683.

[13] D.J.S. Sutton, Compendial Requirements for Automated Microbiological Method Validation: The role of USP Ch 16 Automated methods of Analysis and the proposed Ch 1058 Analytical instrument qualification, PDA Letter • May, 2006.

[14] Guidance for Industry Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products, FDA, 2008.

[15] Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods, ISO/FDIS 16140: 2002.

[16] E. Trullols, I. Ruisánchez, F.X. Rius, J. Huguet, Validation of qualitative methods of analysis that use control samples, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 516- 524.

[17] 5.1.6. Alternative methods for control of microbiological quality, European Pharmacopoeia 5.5 (2006) 4131- 4142.

[18] Guidance Notes on Analytical Method Validation HSA, Manufacturing & Quality audit division; centre for drug administration; GUIDE-MQA-012A-004 (2008) 1-11.

[19] Best practices for Microbiological Methodology, AOAC INTERNATIONAL Appendix G- STWG Executive summary (2006) 1-5.

[20] AOAC INTERNATIONAL Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, Microbiology Guidelines: Journal of AOAC International 82 (1999) 402-416.

[21] R. Boqué, La selectividad en el análisis químico, Universidad Rovira i Virgili Tarragona (2005) 1 – 8.

IV. Parte experimental

IV.1. Equipos

Equipamiento analítico de citometría de flujo con detección fluorimétrica

Citómetro de flujo con detección fluorimétrica el cual consta del **D-*Count*®** y de una unidad de preparación de muestras automatizada (Tecan, Chemunex).

Equipamiento analítico del método tradicional

Cabina de flujo laminar (modelo BV- 30/70, Telstar), dos estufas a temperaturas perfectamente controladas a 32.5 ± 2.5 ºC y 22.5 ± 2.5 ºC (Selecta). Cuenta colonias (IUL Instruments), lector de resultados BBL Crystal (Becton Dickinson) y microscopio.

Otros equipos habituales de laboratorio como balanzas, vórtex y micropipetas.

Todos los equipos cedidos por la empresa Antonio Puig S.A.

IV.2. Muestras cosméticas

Todas las muestras cosméticas han sido cedidas por la empresa Antonio Puig S.A. En los estudios de neutralización del conservante y determinación de los parámetros de calidad, se emplearon los siguientes productos: gel de baño Avena Kinesia, gel de baño Lactovit, Jabón Líquido Muy Suave Denenes, Gel Antiséptico y gel de baño Nelia Hidratante. Para el análisis de productos cosméticos comerciales, se empleó un conjunto representativo recogido en la **Tabla IV.1.**

Tabla IV.1. Productos utilizados para el *test* de equivalencia entre el método tradicional y alternativo.

Productos	
Gel Lactovit	Gel Heno de pravia
Gel Kinesia Protector	Champú Genesse Seco
Gel Hidrogenesse Pieles Sensibles	Champú Heno de Pravia
Jabón Líquido Denenes Felices Sueños	Champú Genesse Graso
Gel Kinesia Xérica Aloe Vera	Gel Agua Agatha Ruiz de la Prada
Gel Hidrogenesse Máxima Hidratación	Gel Avena Kinesia
Gel Milo	Champú Kopos
Gel Kinesia Oliva	Champú Nelia Crema Reparadora
Jabón Líquido Muy Suave Denenes	Champú Genesse Anticaspa Mentol
Gel Kopos Leche y Muesli	Gel VF Tropical
Jabón Crema Heno de Pravia	Champú Genesse Castaño
Gel Hidrogenesse Termal	Champú Nelia Hidratante
Champú Suave Denenes	Gel Nelia Revitalizante
Gel VF Mediterráneo	Gel Neutrogal
Champú Anticaspa de Genesse	Gel Bálsamo Lactovit
Gel Hidrogenesse Relajante	Gel Crema de Ducha Lactovit
Champú Genesse Normal	Jabón Crema Avena Kinesia
Gel Nelia Reafirmante	Gel VF Mil y un Bosques
Gel Heno de Pravia Glicerina	Gel Antiséptico

IV.3. Cepas, medios de cultivo y *kits* de identificación

Las **cepas de referencia** fueron obtenidas de la colección de cultivo de referencia CECT (Cepas Españolas de Colección Tipo), o ATCC (*American Types Culture Collection*). Son microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, catalogados, caracterizados y de origen conocido (ISO 11133-1:2000) [1].

Las cepas utilizadas fueron *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 111), *Staphylococcus aureus* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (CECT 516), *Candida albicans* (CECT 1394), *Aspergillus brasiliensis* (CECT 2574) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Los **medios de cultivo** utilizados en los ensayos fueron los siguientes: Agar triptona soja (TSA) y agar Sabouraud (SB) deshidratados (medios generales para la detección de microorganismos aerobios viables y mohos) (Conda). TSA preparado, agar Levine, agar Cetrimide, agar Baird Parker, agar B.I.G.G.Y. y caldo de triptona soja + tween 80 + lecitina (TSB) (medios generales y específicos) (Maim). El diluyente de farmacopea fue suministrado por Laboratorios AES. Caldo de cultivo ChemBoost C (apto para el citómetro de flujo que permite la neutralización de los conservantes de las muestras cosméticas, el análisis, el enriquecimiento y crecimiento de los microorganismos) (Chemunex).

Los ***kits* de identificación** utilizados fueron los siguientes: *Kit* de tinción de Gram (disolución violeta, disolución lugol, disolución decolorante y rojo safranina) y tiras de oxidasa Bactident (Merck Millipore). *Kit* de identificación API 20 NE (para bacilos Gram negativos no enterobacterias) y API 20 E (para bacilos Gram negativos enterobacteriaceas) (Biomerieux). *Kit* de identificación de Gram positivos BBL Crystal (Becton Dickinson).

IV.4. Reactivos

A continuación, se enumeran los reactivos específicos de citometría de flujo empleados, así como, brevemente, su función. Todos ellos son procedentes de la empresa Chemunex y su composición se mantiene en estricta confidencialidad:

(i) *ChemSol S/1*: se utiliza como líquido vector que permite obtener el flujo laminar en la célula de flujo.

(ii) *Standard* G: permite la calibración del sistema mediante bolas fluorescentes.

(iii) *ChemSol* B13: disolución tampón de marcaje fluorescente.

(iv) *ChemChrome* V13: marcador de viabilidad.

(v) CS13: evita el marcaje no específico.

(vi) CSV: elimina las posibles partículas autofluorescentes que puedan existir y valida los análisis mediante la presencia de bolas fluorescentes utilizadas como estándar interno.

(vii) *Diluent* II y CSR 6: disolución reductora de la fluoresceína libre.

(viii) *Isored*: evita la oxidación de la disolución reductora.

(ix) *Antifoam*: evita la formación de espuma en los residuos.

(x) *Cleaning* 3: disolución utilizada para la limpieza del sistema.

IV.5. Procedimientos

IV.5.1. Preparación de cepas

Se utilizan suspensiones estandarizadas estables de las cepas de colección, en las cuales no se han producido más de 5 pases de la siembra original [2, 3]. Se mantienen en el congelador a –30 ºC aproximadamente, en crioviales que contienen aros de vidrio poroso tratados químicamente, donde los microorganismos están adheridos. Para su preparación se sigue el siguiente procedimiento:

(i) Se toma una cuenta de la cepa deseada y se introduce en TSB; después se pone en estufa a 32.5 ± 2.5 ºC de 2 a 5 horas para el enriquecimiento y revivificación de los microorganismos.

(ii) A continuación se toma 1 mL del caldo y se siembra en superficie en el medio de cultivo apropiado: TSA para bacterias, SB para mohos y levaduras. Después las placas se incuban en estufa durante 3 días a 32.5 ± 2.5 ºC para bacterias y de 5 a 7 días de 22.5 ± 2.5 ºC para mohos y levaduras.

(iii) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observa el crecimiento de las colonias en las placas.

IV.5.2. Recuento de cepas

(i) Se parte de una colonia de la cepa de cultivo puro obtenida en placa, que se introduce en un tubo que contiene una disolución tamponada de peptona-cloruro sódico pH 7.0 (diluyente de farmacopea) denominado tubo madre. A partir de éste, se realizan diluciones seriales (inicialmente 6 diluciones con un factor de dilución de 10 entre ellas).

(ii) De cada una de las diluciones, se toma 1 mL y se siembra por el método de siembra en masa, en dos placas Petri a las que se le añade medio TSA [2]. Para mohos y levaduras, la siembra es igualmente en dos placas a las que se añade medio de cultivo SB, pero para *Aspegillus brasiliensis* la siembra es en superficie, debido a que es aerobio estricto y no crece si es atrapado en el medio de cultivo.

(iii) Las siembras se incuban en estufa a 32.5 ± 2.5º C (bacterias, placas TSA, 3 días) y a 22.5 ± 2.5 ºC (mohos y levaduras, placas SB, 5-7 días). Una vez pasado el tiempo de incubación, se cuentan las colonias, y se elige aquella dilución que tenga el recuento de colonias dentro del límite de cuantificación (25-250 u.f.c./placa [2, 4] para bacterias en TSA; para mohos en SB el recuento en placa puede ser inferior debido al tamaño que ocupan). Por tanto, el número de microorganismos en el tubo madre, será el recuento de microorganismos de la placa elegida, multiplicado por 10 elevado a n, donde n es el número de diluciones realizadas a partir del tubo madre.

(iv) Una vez obtenido el número de microorganismos, se toma la dilución que posea el número de microorganismos que deseemos inocular.

IV.5.3. Neutralización del conservante

Para realizar el estudio de neutralización, se necesitan dos muestras para cada ensayo, puesto que se realiza mediante la comparación entre ellas. Por una parte, la muestra control, que contiene sólo el caldo de cultivo y, por otra, la muestra de estudio que contiene el caldo de cultivo y el gel añadido al cual se quiere neutralizar el conservante. Las diluciones del gel estudiadas fueron 1/10 y 1/100 (p/p).

El procedimiento y criterio de aceptación seguido, se basa en la Farmacopea Europea [4] y se describe a continuación:

(i) Preparar el número de microorganismos a recuperar para que haya menos de 100 u.f.c. En esta Tesis Doctoral se ha querido añadir además que el valor mínimo a añadir sea 25 u.f.c. por ser este último valor, el límite de cuantificación inferior en placa a partir del cual existe menos variabilidad de resultados. El volumen añadido de microorganismos debe ser menor que el 1% del volumen del producto diluido [6].

(ii) Las cepas utilizadas son: *Pseudomonas aeruginosa* CECT 111, *Staphylococcus aureus* ATCC 9027, *Escherichia coli* CECT 516, *Candida albicans* CECT 1394, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Aspergillus brasiliensis* CECT 2574, y se preparan según los procedimientos especificados en **IV.5.1** y **IV.5.2**. Las cuatro primeras cepas se utilizan para la neutralización del conservante, debido a que son las cepas no permitidas según especificaciones cosméticas y, las dos últimas, por ser cepas indicadoras de resistencia a la esterilización [5].

(iii) En condiciones asépticas, se realizan las diluciones 1/10 (p/p) (10 g de producto en 90 g de diluyente de farmacopea) y 1/100 (p/p) (1 g de producto en 99 g de diluyente) y se homogenizan.

(iv) A continuación se inoculan los microorganismos especificados anteriormente, individualmente a cada producto, y se siembran en masa en medio de cultivo TSA a distintos tiempos (t = 0 h, t = 30 min. y t = 1 h), para comprobar si existe cambio en el número de microorganismos recuperados, debido a los agentes químicos del caldo de cultivo (excepto *Candida albicans* que se siembra en SB y *Aspergillus brasiliensis* el cual también se siembra en SB, pero en superficie debido a que es aerobio estricto y en masa no existe crecimiento). El propósito de la siembra a distintos tiempos, es optimizar el tiempo de contacto entre el caldo de cultivo, gel y microorganismos, para que se cumpla el criterio de aceptación de la neutralización. Por cada muestra, se siembran dos placas para que el resultado sea más representativo.

(v) Paralelamente a las muestras de estudio, se prepara una muestra control (100 mL de diluyente + la cepa correspondiente) que no contiene producto, sembradas al igual que anteriormente, en masa en medio de cultivo TSA (excepto *Candida albicans* que se siembra en SB y *Aspergillus brasiliensis*, que se realiza siembra en SB y en superficie por ser aerobio estricto), y siguiendo los mismos tiempos establecidos propuestos en el punto (iv), para comparar los resultados obtenidos entre las muestras con gel y sin gel (muestra de control).

(vi) Por último se incuban las placas durante 3 días a 32.5 ± 2.5º C, excepto *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis,* que se

incuban de 5 a 7 días a 22.5 ± 2.5 ºC y se efectúa el recuento de los microorganismos encontrados en las placas Petri.

El criterio de aceptación seguido es el recogido en la Farmacopea Europea [4], debiéndose cumplir que, de los microorganismos inoculados en la muestra, deben recuperarse, al menos, la mitad de ellos (50 % de los microorganismos) y debe cumplirse para todas las cepas estudiadas.

En efecto, si al inocular una cantidad de 100 u.f.c. al finalizar el proceso de neutralización, recuperamos las 100 u.f.c. podría decirse que el conservante no ha actuado y éste se ha neutralizado. Si por el contrario, recuperamos en el otro límite, 0 u.f.c., sería indicativo de que el conservante ha actuado y, en consecuencia, no se habría neutralizado. Entre estos dos límites, la Farmacopea Europea, exige la recuperación de, al menos, el 50 % de los microorganismos inoculados. Es preciso indicar de nuevo que, en aras de un control adecuado, la neutralización del conservante es de necesario aseguramiento.

IV.5.4. Análisis por el método tradicional cosmético

El método tradicional cosmético se lleva a cabo por el método de recuento en placa, que consiste en mezclar una alícuota del producto o de una dilución del mismo, con un medio nutritivo de cultivo, que contenga agar, e incubar durante el tiempo suficiente para el desarrollo de colonias microbianas. Como resultado, nos indicará el número de microorganismos presentes en la muestra [7]. El procedimiento es el siguiente:

(i) Neutralización del conservante de las muestras cosméticas, añadiendo 1 g de producto en 99 g de diluyente (dilución 1/100 (p/p)), en condiciones asépticas. Se homogeniza la muestra y se esperan 30 minutos para completar la neutralización del conservante.

(ii) Siembra en placa (por duplicado) e incubación durante 3 días a 32.5 ± 2.5º C, para llevar a cabo, posteriormente, el recuento de microorganismos aerobios viables.

(iii) Contaje promediado de los microorganismos encontrados.

(iv) Paralelamente, para ver la presencia o ausencia de patógenos no permitidos en especificaciones, se siembra en los medios selectivos establecidos [8 – 11].

Una vez obtenida la presencia de microorganismos, en medios selectivos y/o en medio general, en caso de querer confirmar su identificación se siguen los siguientes pasos:

(i) En primer lugar se realiza una tinción de Gram, para clasificar los microorganismos en positivos o negativos y determinar sus características morfológicas clasificándolos en bacilos o cocos.

(ii) Si son Gram negativos, la siguiente clasificación es a través de la prueba de la oxidasa, para clasificarlos también en positivos y negativos.

(iii) Dependiendo de la clasificación de Gram, se utilizan los *test* bioquímicos correspondientes, para confirmar su identificación.

IV.5.5. Análisis por el método de citometría de flujo

El procedimiento para detectar células viables incluyendo levaduras es el siguiente:

(i) Neutralización del conservante de las muestras cosméticas, añadiendo 1 g de producto en 99 g de diluyente (dilución 1/100 (p/p)), en condiciones asépticas. Se homogeniza la muestra y se incuba durante 24 h a 32.5 ± 2.5º C, no sólo para la neutralización del conservante, sino para el acondicionamiento de la muestra y la proliferación de microorganismos en el caso de que los haya.

(ii) Se homogeneiza el caldo incubado de la muestra a analizar.

(iii) Se añaden 100 µL de muestra (caldo incubado) en tubos de 5 mL.

(iv) Los tubos se cargan en la unidad de preparación de la muestra.

A continuación, la parte automática del equipo realiza las siguientes etapas:

(i) Adición del reactivo CSV en cada cápsula de los filtros.

(ii) Adición del reactivo CS13.

(iii) Adición del substrato marcador y la disolución (V13 + B13).

(iv) Incubación de las muestras (12 ± 1 min. a 30º ± 3°C)

(v) Adición del agente reductor (CSR + Diluent II).

(vi) Medida de la fluorescencia en 100 µL de la suspensión marcada.

IV.5.6. Determinación de los parámetros de calidad

Para la determinación de los parámetros de calidad, cada uno de los geles de baño se estudia con las distintas cepas de referencia mencionadas, no permitidas en especificaciones cosméticas, atendiendo al siguiente procedimiento:

(i) Preparación de cada una de las cepas a concentraciones teóricamente lo más bajas posibles (cercanas a 1 u.f.c./placa). Para ello se sigue la preparación y recuento de microorganismos definido en los puntos **IV.5.1.** y **IV.5.2.**

(ii) Neutralización del conservante de las muestras cosméticas, añadiendo 1 g de producto en 99 g de diluyente (dilución 1/100 (p/p)), en condiciones asépticas. Se homogeneiza la muestra y se espera 30 min para completar la neutralización. Se preparan 8 muestras para cada concentración de microorganismos.

(iii) Inoculación de las distintas concentraciones de microorganismos e incubación de las muestras a 32.5 ± 2.5º C durante 24 h.

(iv) Siembra paralela de las distintas concentraciones de microorganismos en placa de TSA por duplicado, para confirmar y llevar a cabo el recuento de los microorganismos inoculados.

(v) Preparación y medida de un blanco (diluyente + producto, sin cepas) para comprobar que se trabaja asépticamente.

(vi) Análisis por triplicado al menos de las muestras en el citómetro de flujo [12].

(vii) Siembra paralela en placa (por duplicado), para comprobar que se obtiene el mismo resultado (presencia o ausencia) por ambos métodos empleando medios de cultivo general (TSA) y los específicos para cada microorganismo inoculado según corresponda.

IV.5.7. Análisis de productos cosméticos comerciales

(i) Análisis de las muestras en el citómetro de flujo según procedimiento detallado en el punto **IV.5.5.**

(ii) Adicionalmente, partiendo del caldo de cultivo incubado utilizado para el análisis de citometría, se siembra una placa adicional para comprobar resultados.

(iii) Análisis convencional de las muestras por el método tradicional cosmético (**IV.5.4.**).

(iv) Comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos.

IV.6. Referencias bibliográficas

[1] A. I. Cuesta, Curso Acreditación de Laboratorios de Microbiología de Alimentos, FAO, 2008.

[2] < 61> Microbial Limit Test and Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests, USP 31(2008) 71-80.

[3] <1227> Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles, USP31– NF 26 1 (2008) 687-690.

[4] 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: total viable aerobic count, European Pharmacopoeia 5.6. (2006) 166 – 172.

[5] 5.1.2. Biological indicators of sterilisation, European pharmacopeia 5.0 (2006) 447.

[6] < 51> Antimicrobial Effectiveness Testing, USP 31(2008) 67.

[7] S. Antúnez, Mª D. González, P. Lombarte, F. Niubó, MªP. Oliver, R. Ortega, M. Prats, Validación del método de control de la contaminación microbiana en productos no obligatoriamente estériles, Monografías AEFI (Sección catalana), 1993.

[8] Cosmetics – Microbiology - Detection of *Escherichia coli*, ISO 21150: 2006.

[9] Cosmetics - Microbiology - Detection of *Pseudomonas aeruginosa*, ISO 22717: 2006.

[10] Cosmetics – Microbiology - Detection of *Staphylococcus aureus*, ISO 22718: 2006.

[11] Cosmetics - Microbiology - Detection of *Candida albicans*, ISO 18416: 2007.

[12] Guidance for Industry Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products FDA, 2008.

V. Resultados y discusión

En primer lugar, resulta preciso indicar que el trabajo de investigación realizado en esta Tesis Doctoral consiste en demostrar que el método alternativo propuesto por citometría de flujo para el análisis de geles de baño cumple con el denominado uso previsto (*fitness for purpose*) y que constituye en sí mismo el fundamento de su validación analítica. El uso previsto consiste en *el cumplimiento de las especificaciones cosméticas y en la obtención de resultados de igual o mejor calidad en un tiempo menor que el establecido por el método tradicional.*

Para tal fin, por una parte, el cumplimiento de especificaciones cosméticas exige por parte del método alternativo, el cumplimiento del recuento de microorganismos (< 1000 u.f.c./g o mL para cosméticos de uso general y <100 u.f.c./g o mL para productos que se aplican en bebés). Dicho recuento conlleva el aseguramiento de la viabilidad del criterio instrumental de clasificación de las muestras (proporcionado por el proveedor) y el análisis de los falsos resultados para llevar a cabo la evaluación analítica de la fiabilidad, la sensibilidad y la especificidad.

A su vez, el aseguramiento sobre el cumplimiento de la especificación de recuento vendrá determinada por el límite de detección del método. En efecto, si el límite de detección obtenido es menor de 100 u.f.c./g o mL (la especificación más restrictiva de recuento encontrada), un resultado negativo indicará que cumple con las especificaciones de recuento mientras que un límite de detección superior a 100 u.f.c. /g o mL no resultará válido para tal fin. Asimismo, si el límite de detección del método alcanzara el valor correspondiente a tan sólo un microorganismo, el método tendrá la capacidad de detectar presencia o ausencia de las cepas patógenas prohibidas cumpliendo así con el segundo requisito de las especificaciones.

Todos estos estudios, se han llevado a cabo estudiando el comportamiento mediante la inoculación controlada e individual de cada una de las cepas patógenas prohibidas (bacterias *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y levadura *Candida albicans*) en un conjunto de muestras cosméticas representativas procedentes de diferentes productos comerciales de la empresa Antonio Puig S.A. (geles de baño Avena Kinesia, Lactovit, Jabón Líquido Muy Suave Denenes, Gel Antiséptico y Nelia Hidratante).

Los resultados obtenidos en este tipo de estudios se expondrán y discutirán en el apartado **V.2.**

Por otra parte, para demostrar que el método alternativo genera resultados de igual o mejor calidad y en un tiempo menor que el método tradicional según exige el uso previsto, se han de llevar a cabo los estudios analíticos correspondientes a los *tests* de equivalencia en los productos cosméticos acabados y aptos para su comercialización.

Finalmente, la evaluación de la reducción del tiempo de análisis por el método alternativo de citometría de flujo en comparación con el empleado por el método tradicional cosmético, se realiza a partir del parámetro de productividad, tiempo de análisis.

Los resultados obtenidos en este tipo de estudios se expondrán y discutirán en los apartados **V.3** y **V.4** respectivamente.

V.1. Optimización de la eliminación del conservante: neutralización química y por dilución

Antes de comenzar con la evaluación de los parámetros analíticos críticos para el uso previsto del método alternativo de citometría de flujo para el análisis de muestras cosméticas es imprescindible llevar a cabo la **neutralización del conservante** en los productos a estudiar.

El conservante de los productos cosméticos es una parte esencial de los geles de baño, cuya finalidad es la conservación del producto una vez comercializado, para garantizar unas condiciones óptimas del producto a lo largo de su vida y, en consecuencia, asegurar la salud y satisfacción del cliente, bien destruyendo o inhibiendo el crecimiento de microorganismos que puedan existir o incorporarse durante el uso del producto. La neutralización o eliminación del conservante de un producto cosmético, es un paso clave en el análisis de un producto cosmético para poder detectar los microorganismos existentes en una muestra, si los hubiere [1].

En la práctica, no efectuar la neutralización del conservante, conllevaría a que los microorganismos existentes en la muestra, no aparecieran o lo hicieran en menor medida con respecto a los que contiene la muestra originalmente en el momento del análisis, conduciendo así a resultados erróneos [2]. Estos resultados erróneos podrían ocultar una mala praxis del proceso de fabricación que podría producir ulteriormente un riesgo para la salud del usuario. Por ello, la optimización de la eliminación del conservante, es la base para realizar los ensayos posteriores, tanto del método tradicional de siembra en placa, como para los realizados por el método alternativo de citometría de flujo.

En este trabajo de investigación, para neutralizar los conservantes de los productos estudiados, se ha combinado la neutralización **química y**

por dilución. La neutralización **química** la aportan los agentes químicos del caldo de cultivo, el cual lleva neutralizantes de conservantes cosméticos, aunque en este caso concreto, su composición es confidencial (secreto comercial). Con la neutralización por **dilución**, no sólo se ayuda a la disminución de la concentración del conservante, sino que también ayuda a acondicionar la muestra cosmética, tanto para el análisis en el equipo de citometría de flujo, como para el método tradicional, ya que el análisis directo de la muestra sin dilución, no es posible debido a la viscosidad del producto. Además, la Farmacopea Europea recomienda esta última opción de neutralización para el sorbato potásico, que aunque componente minoritario del conservante formado por benzoato sódico y sorbato potásico, es predominante en el grupo de geles elegidos [3].

A la hora de realizar la neutralización del conservante y con el propósito de generalizar y abarcar la máxima variedad de materias primas y conservantes, se han elegido los siguientes productos que aparecen en la **Tabla V.1.**

Tabla V.1. Geles y conservantes empleados en los estudios de neutralización.

Productos cosméticos	Abrev.	Conservante
Gel Avena Kinesia	Av. Kin.	Benzoato sódico y Sorbato potásico
Gel Lactovit	Lac.	Benzoato sódico y Sorbato potásico
Jabón Líquido Muy Suave Denenes	Dnn.	Benzoato sódico y Sorbato potásico
Gel Antiséptico	Ger.	2-Bromo-2-Nitropropano-1,3- Diol 2, 4-Dichlorobenzyl Alcohol
Gel Nelia Hidratante	Nel.	Isotiazolinonas

Los estudios de neutralización del conservante se han llevado a cabo mediante la inoculación individual de cada cepa no permitida y objeto de estudio (*P. aeruginosa, S. aureus, E. coli* y *C. albicans)* más las especificadas en la Farmacopea Europea (*Bacillus subtilis* y *Aspergillus brasiliensis*) en dos diluciones 1/10 (p/p) y 1/100 (p/p) y siguiendo el procedimiento especificado en la parte experimental (**IV.5.3.**).

Los resultados obtenidos en la monitorización de las muestras cosméticas a dilución 1/10 (p/p) se muestran en las **Tablas V.2. - V.6.** En estas tablas, se muestra el porcentaje de recuperación de microorganismos obtenidos en presencia de producto cosmético comercial, frente a los recuperados en ausencia de producto cosmético (muestras de control) [4]. De acuerdo al criterio de aceptación, si los microorganismos recuperados en las muestras con productos cosmético, son superiores al 50 % de los inoculados inicialmente, el conservante en esas muestras y para la cepa inoculada se habrá neutralizado. Pero es necesario, para afirmar que se produce la neutralización de un producto cosmético, que este criterio se cumpla frente a todas las cepas estudiadas. Además en estas tablas se indican aquellos resultados en los que no se ha conseguido la neutralización del conservante, resaltándose en negrita.

Como puede deducirse de los resultados, se encuentran comportamientos diferentes en función del microorganismo inoculado y del producto comercial ensayado. Sin embargo, se puede deducir que, en estas condiciones de dilución y para los diferentes tiempos ensayados, no se alcanzan las condiciones experimentales óptimas que nos permitan una neutralización completa del conservante, no consiguiéndose una tasa superior al 50 % de los microorganismos inoculados en todas las cepas. Sin embargo, resultó interesante el hecho de que los productos Ger. y Nel., exhibieron un comportamiento de mayor poder conservante que los

otros productos, debido a que resultó más difícil recuperar los microorganismos inoculados. Esto coincide con el hecho de que estos dos productos llevan conservantes distintos al resto de productos (ver **Tabla V.1.**).

Del conjunto de todos estos resultados, puede decirse que la dilución 1/10 (p/p) de los productos elegidos a los distintos tiempos estudiados, no es una dilución aceptable para neutralizar el conservante de los productos cosméticos estudiados y en consecuencia, se ensayó con una dilución mayor (1/100 (p/p)).

Los resultados obtenidos en la monitorización de las muestras cosméticas a dilución 1/100 (p/p) se muestran en las **Tablas V.7. - V.11.**

Como se puede deducir de los resultados en todos los casos, se recuperan todas las cepas, según el criterio de aceptación, excepto para *Staphylococcus aureus* a tiempo cero en Av. Kin. y para *Pseudomonas aeruginosa* a tiempo cero en Ger. Sin embargo, a partir de 30 minutos después de poner en contacto cepa y productos, no hay excepción y la recuperación en todas las cepas supera la mitad del número inoculado de microorganismos, cumpliéndose de este modo el criterio de aceptación de la Farmacopea Europea.

En consecuencia, del conjunto de los resultados obtenidos se puede concluir que la dilución 1/100 (p/p) es la óptima para la neutralización de los conservantes en los productos estudiados cuando se siembra a los 30 minutos de contacto entre la cepa inoculada y el producto cosmético bajo estudio. Esta dilución y tiempo, es la que se empleará para la neutralización de los conservantes de los productos estudiados.

Es importante destacar que para Dnn., al ser un producto para bebes su especificación de recuento es inferior a 100 u.f.c./g o mL de producto, con lo que la dilución 1/100 (p/p) para la recuperación de los microorganismos, se encuentra en el límite de aceptación del producto en el método tradicional.

Resultados obtenidos en dilución 1/10 (p/p)

Tabla V.2. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Av. Kin. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P.aeruginosa	36	39	108	38	28	74	24	36	150
S. aureus	65	42	65	107	57	53	117	63	54
E. coli	62	48	78	76	72	95	78	54	69
C. albicans	62	34	56	54	56	105	62	44	70
A.brasiliensis	69	47	68	67	62	93	45	55	120
B. subtilis	**81**	**8**	**10**	**79**	**8**	**11**	**68**	**8**	**12**

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.3. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Lac. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	32	89	38	37	97	24	44	183
S. aureus	65	44	68	107	61	57	117	76	65
E. coli	**62**	**27**	**43**	76	44	58	78	55	71
C. albicans	62	56	90	54	52	96	62	45	73
A. brasiliensis	69	59	86	67	63	93	45	50	111
B. subtilis	**58**	**0**	**0**	**39**	**0**	**0**	**45**	**0**	**0**

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.4. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Dnn. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	28	78	38	37	97	24	31	129
S. aureus	**65**	**17**	**27**	**107**	**32**	**30**	**117**	**30**	**26**
E. coli	62	33	53	76	45	59	78	58	74
C. albicans	**74**	**35**	**48**	74	69	93	74	53	72
A. brasiliensis	69	60	88	67	52	78	45	51	112
B. subtilis	73	49	67	**106**	**52**	**13**	95	51	54

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.5. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Ger. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	**36**	**13**	**36**	**38**	**15**	**39**	24	27	112
S. aureus	65	58	90	107	82	77	117	62	53
E. coli	62	37	60	76	64	84	78	45	57
C. albicans	74	44	60	74	46	62	**74**	**36**	**48**
A. brasiliensis	**69**	**0**	**0**	**67**	**0**	**0**	**45**	**0**	**0**
B. subtilis	**73**	**22**	**30**	**106**	**24**	**22**	**95**	**24**	**25**

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.6. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Nel. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	**36**	**2**	**5**	**38**	**0**	**0**	**24**	**0**	**0**
S. aureus	65	40	61	107	76	71	117	63	54
E. coli	**62**	**20**	**33**	76	75	98	78	69	88
C. albicans	**74**	**0**	**0**	**74**	**1**	**1**	**74**	**0**	**0**
A. brasiliensis	69	37	54	67	55	81	45	44	97
B. subtilis	**73**	**1**	**1**	**106**	**1**	**1**	**95**	**0**	**0**

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Resultados obtenidos en dilución 1/100 (p/p)

Tabla V.7. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Av. Kin. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	60	167	38	41	108	24	33	137
S. aureus	**65**	**0**	**0**	107	60	56	117	62	53
E. coli	62	47	77	76	58	76	78	78	71
C. albicans	62	34	56	54	56	105	62	44	70
A. brasiliensis	69	60	87	67	48	71	45	51	113
B. subtilis	81	76	94	79	79	100	68	79	116

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.8. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Lac. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	29	80	38	40	105	24	34	142
S. aureus	65	79	122	107	91	85	117	100	85
E. coli	62	75	122	76	57	75	78	59	76
C. albicans	62	41	67	54	38	71	62	39	62
A. brasiliensis	69	59	86	67	63	93	45	59	131
B. subtilis	58	38	65	39	30	77	45	51	112

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.9. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Dnn. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	35	99	38	24	63	24	29	121
S. aureus	65	100	154	107	108	100	117	131	112
E. coli	62	50	81	76	73	95	78	63	80
C. albicans	74	57	77	74	72	97	74	74	100
A. brasiliensis	69	50	73	67	47	70	45	43	94
B. subtilis	73	114	156	106	117	110	95	122	128

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además, se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.10. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Ger. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	**36**	**15**	**42**	38	44	116	24	31	129
S. aureus	65	105	162	107	119	111	117	97	82
E. coli	62	53	86	76	52	68	78	48	62
C. albicans	74	61	82	74	64	87	74	53	71
A. brasiliensis	69	57	83	67	45	67	45	58	129
B. subtilis	73	91	124	106	140	131	95	84	88

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo + gel + cepa). Además se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización. Se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

Tabla V.11. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Nel. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos [a].

Cepa	Tiempos de incubación (min.)								
	t = 0			t = 30			t = 60		
	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)	Control	Gel	R (%)
P. aeruginosa	36	22	61	38	35	92	24	47	196
S. aureus	65	87	134	107	65	61	117	93	80
E. coli	62	44	72	76	68	89	78	78	69
C. albicans	74	53	72	74	55	74	74	42	57
A. brasiliensis	69	37	54	67	57	84	45	50	111
B. subtilis	73	57	77	106	57	53	95	76	80

[a] Resultados expresados en u.f.c./placa. Para cada tiempo de incubación se especifica el resultado de la muestra control (caldo + cepa) y el resultado de la muestra de estudio, denominada "Gel" (caldo+ gel + cepa). Además se especifica el porcentaje de recuperación de microorganismos (R) para su comparación y aplicación del criterio de neutralización y se resalta en negrita aquellos resultados que no superan el criterio instrumental de clasificación.

V.2. Evaluación de los parámetros de calidad: establecimiento de las tablas de contingencia y las curvas características de funcionamiento

Una vez neutralizado el conservante, para realizar la evaluación del método de cribado alternativo de citometría de flujo con detección fluorimétrica, se lleva a cabo el **estudio de los parámetros de calidad críticos** de dicho método alternativo. Con tal motivo, se diseñó un conjunto de experimentos que permitieron la evaluación de los parámetros de calidad expresados a través del establecimiento de tablas de contingencia y de curvas características de funcionamiento. Asimismo, y para tal fin, se eligió un conjunto de muestras de geles, representativas de toda la cadena comercial de la empresa Antonio Puig S.A. (los mismos productos estudiados en la optimización de la neutralización del conservante) y se estudió la inoculación de cada una de las cepas prohibidas en dichos productos (*P. aeruginosa, S. aureus, E. coli* y *C. albicans)*.

En efecto, para llevar a cabo el establecimiento de las tablas de contingencia y de las curvas características de funcionamiento, se llevaron a cabo inoculaciones controladas de estas cepas a bajas concentraciones, llegando a realizar incluso la inoculación de un sólo microorganismo por g de producto, con el objetivo de explorar las posibilidades del método para detectar ausencia total de microorganismos.

Este hecho de procurar la inoculación individual de cada uno de los microorganismos prohibidos en las muestras cosméticas conduce a una dificultad experimental importante. En efecto, a medida que se disminuye el nivel de microorganismos inoculados, la probabilidad de no inocular microorganismo alguno aumenta. Por tanto, habrá muestras donde tal inoculación se haya realizado y otras en las cuales no haya surtido efecto.

Este hecho conduce a que, previamente a cualquier evaluación, resulta preciso asegurar en qué muestras se ha realizado una verdadera inoculación. Esto se resuelve sembrando las muestras por el método tradicional en medios de cultivo generales y selectivos, para el crecimiento de cada microorganismo objeto de estudio (según las condiciones expuestas en la parte experimental **IV.5.6.**). Así se confirma en qué muestras la inoculación a bajos niveles se ha llevado a cabo de manera eficaz y fiable, descartando para los estudios de la validación ulterior, aquellas no inoculadas. Asimismo, resulta preciso indicar que existen algunas muestras en las que aparecen, lo que se ha denominado "otros microorganismos", cuyos resultados se descartan. Estos microorganismos no corresponden a las cepas patrón inoculadas artificialmente, puesto que, aparecen en medio general (TSA), pero no en medio selectivo. Por tanto, son debido a una contaminación de la muestra mediante microorganismos procedentes de otras fuentes, distintas a las cepas inoculadas.

Por otra parte, resulta preciso indicar que los resultados obtenidos se evaluaron teniendo en cuenta el criterio instrumental de clasificación, propuesto por la casa comercial, para el aseguramiento de la calidad microbiológica y aceptada como hipótesis de partida en este trabajo. Este criterio, recogido en la **Tabla V.12.** es el elegido para llevar a cabo el cribado o *screening* de muestras, el cual establece que, una muestra es positiva (presencia de microorganismos) cuando se obtiene un resultado mayor de 500 contajes/mL de muestra analizada. Una muestra es negativa (ausencia de microorganismos), si el contaje es menor de 100 contajes/mL y una muestra es dudosa cuando el resultado que se obtiene está comprendido en un intervalo de señales entre 100 y 500 contajes/mL. Este último intervalo de señales corresponde teóricamente a la región de incertidumbre en la clasificación de las muestras.

Tabla V.12. Criterio instrumental de clasificación de las muestras aceptado durante el control de calidad de productos cosméticos, empleando el método alternativo de citometría de flujo con detección fluorimétrica.

Tipo de resultado	Intervalo establecido (contajes/mL)
Negativo	<100
Dudoso	100 – 500
Positivo	>500

En los resultados obtenidos por el citómetro de flujo, cada contaje corresponde a un microorganismo individualmente detectado, ya que las bacterias y levaduras estudiadas son microorganismos unicelulares. Sin embargo, el resultado obtenido, no corresponde a la concentración que había en el caldo de cultivo antes del análisis con el citómetro de flujo, dado que la adición requerida de reactivos hace que la muestra esté diluida 20 veces. En consecuencia, para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en el método alternativo, y saber cuántos microorganismos/mL existen realmente en la muestra después de la incubación, resulta preciso tener en cuenta la dilución en la muestra realizada por el citómetro de flujo, que se traduce en multiplicar por un factor de 20. En efecto, si se obtiene un resultado de 500 contajes/mL en el citómetro de flujo (resultado positivo), significa que la concentración de la muestra es de 10000 u.f.c./mL. Por otra parte, un valor de 100 contajes/mL corresponde a una concentración de 2000 u.f.c./mL.

De esta información, se extrae que aquellas muestras que contengan una cantidad de microorganismos inferior a 2000 u.f.c./mL, después del período de incubación de 24 h en las condiciones de cultivo del método, no se detectarán en el método de citometría de flujo y por ello, serán clasificadas como muestras negativas, por lo que es una limitación del método.

V.2.1. Análisis de blancos

En primer lugar, se han estudiado los blancos de reactivo [7, 8] constituidos solamente por el caldo de cultivo en ausencia de producto cosmético para ver la contribución a la señal analítica obtenida [9]. Este caldo de cultivo se emplea durante todo el estudio para la dilución y proliferación de microorganismos. Aunque este análisis no contiene producto, se han seguido las mismas condiciones analíticas empleadas que para la determinación de los parámetros de calidad, obviando el paso de la inoculación de los microorganismos. Es decir, se parte de la incubación de la muestra durante 24 horas a 32.5 ± 2.5º C y posteriormente se analiza por citometría de flujo (apartado **IV.5.5.**).

A continuación, se evalúan los blancos de muestras, constituidos por el caldo de cultivo más los geles objeto de estudio. Al igual que en los blancos de reactivos, se sigue el mismo procedimiento que para la evaluación de los parámetros de calidad, (dilución 1/100 (p/p) para la neutralización del conservante e incubado 24 horas a 32.5 ± 2.5º C) que consigue además acondicionar la muestra cosmética para que sea filtrable y pueda analizarse en el citómetro de flujo.

Todas las muestras, tanto de blancos de reactivo como de muestra, se siembran paralelamente en medio de cultivo general, para corroborar la ausencia de microorganismos. Los datos obtenidos para los blancos, tanto de reactivo como de muestra, se han recogido en los **Anexos VII.1. y VII.2.** cuyos resultados se discuten a continuación.

En la **Figura V.1.** se resumen los resultados obtenidos para los blancos de reactivo y de muestra. Como se puede observar para los blancos de reactivo, el 95.4 % de todos los resultados analizados arrojan señales analíticas por debajo de 100 contajes/mL y el 4.6 % restante se

reparte en el intervalo dudoso (de 100 a 500 contajes/mL), no existiendo blancos de reactivos que arrojasen valores superiores a los 500 contajes/mL (**Tabla VII.1.1.** del **Anexo VII.1.)**.

Respecto a los blancos de muestra (ver tablas del **Anexo VII.2.**), como cabría de esperar y al igual que en el caso de blancos de reactivos, la mayoría de los resultados aparecen de 0 a 100 contajes/mL, intervalo que va desde el 88.5 % para Av. Kin., hasta el 99 % para Ger. Entre 100 y 200 contajes/mL aparece un pequeño porcentaje de resultados que va disminuyendo según aumenta el valor de la señal analítica. Ningún gel en el caldo de cultivo, proporcionó contajes por encima de 400 contajes/mL.

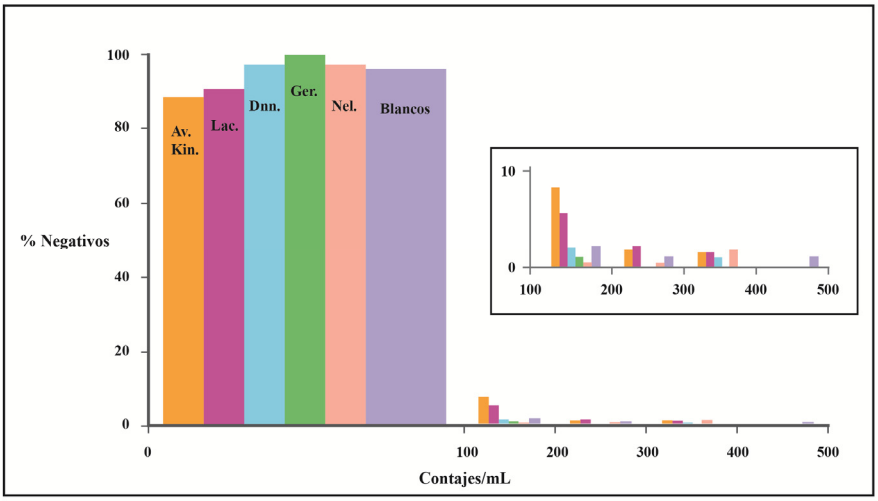

Figura V.1. Porcentaje de resultados negativos obtenidos en los blancos de reactivo y en los blancos de muestra para cada uno de los productos estudiados.

A la luz del conjunto de estos resultados, se puede deducir que el criterio de cribado empleado como hipótesis de partida (**Tabla V.12.**), resulta adecuado al clasificar todos los blancos de muestra como tales; es decir, con señales analíticas por debajo de 100 contajes/mL indicando a su vez ausencia de microorganismos. A la luz del criterio instrumental de

clasificación establecido, aparece un pequeño porcentaje en el intervalo de los resultados dudosos, de los cuales al confirmar en placa, todos son negativos poniéndose doblemente de manifiesto la adecuación del criterio tomado para el cribado empleando el método alternativo de citometría de flujo.

A continuación se mostrarán los resultados obtenidos en los estudios de inoculación controlada de cada uno de los microorganismos no permitidos por la especificación adoptada en este trabajo de investigación a diferentes niveles de concentración y utilizando las muestras de geles estudiadas con anterioridad y, como ya se indicó, representativas de la cadena de producción de Antonio Puig S.A.

V.2.2. Estudio analítico de inoculación con *Pseudomonas aeruginosa*

Sobre el conjunto de productos comerciales elegidos e indicados anteriormente, se llevaron a cabo inoculaciones controladas comprendidas entre 1 y 5 microorganismos de *Pseudomonas aeruginosa*/g de producto que constituye una de las cepas no permitidas según las especificaciones microbiológicas y cuya procedencia es el agua. Los resultados correspondientes a la monitorización de las muestras cosméticas inoculadas con *P. aeruginosa* se han agrupado en las tablas recogidas en el **Anexo VII.3.**

El resumen de los resultados obtenidos para cada uno de los niveles inoculados y para cada una de las muestras analizadas se muestra en la **Tabla V.13.** En dicha tabla, se muestra para cada nivel de inoculación, el número total de análisis realizados, el número de análisis positivos y negativos obtenidos por el método alternativo, así como las probabilidades de cada uno de ellos. Se ha creído conveniente incluir los resultados obtenidos a 0 u.f.c./g (correspondientes al número total de análisis de blancos de reactivos y muestras). Como se puede observar en la **Tabla V.13.** en este tipo de estudios, se encontraron diferentes comportamientos. En efecto, por una parte, para los productos Av. Kin. y Dnn., con independencia del nivel de inoculación de *P. aeruginosa,* la respuesta analítica instrumental obtenida fue siempre superior a 500 contajes/mL clasificando en consecuencia todas las muestras como positivas. Por su parte, un comportamiento muy similar fue obtenido para el producto Lac. aunque los contajes superiores a 500 contajes/mL se dieron cuando la inoculación se correspondió con 0.9 u.f.c./g y superiores. Sin embargo, los productos Ger. y Nel. no arrojaron valores superiores a 500 contajes/mL en los niveles estudiados; probablemente, debido al hecho de que estos dos productos tienen, por su formulación, una actividad microbicida

mayor que el resto de geles (diferente conservante), no permitiéndose el crecimiento de esta cepa a niveles tan bajos. Es preciso destacar que estos resultados están en coherencia con los obtenidos en los estudios previos correspondientes a la neutralización del conservante.

Por otra parte, es preciso señalar que, del conjunto de blancos de reactivos y muestras en las cuales no se ha producido inoculación, todos los resultados obtenidos por el método de citometría de flujo arrojaron valores inferiores a los 400 contajes/mL, clasificando éstas muestras como negativas.

Acorde con el criterio instrumental de clasificación establecido inicialmente, existe un intervalo dudoso entre 100 y 500 contajes/mL, pero a la luz de los resultados obtenidos con *P. aeruginosa* y los distintos productos analizados, este criterio se puede simplificar quedando de la siguiente manera:

- >500 contajes/mL resultado positivo
- <500 contajes/mL resultado negativo

En segundo lugar, y una vez comprobada la viabilidad del criterio instrumental de clasificación de estos productos cosméticos para esta cepa, se midieron todas las muestras inoculadas por ambos métodos, el alternativo y tradicional, incluyendo en este último la siembra en medio general y selectivo para *P. aeruginosa*, con el fin de evaluar los parámetros analíticos críticos de calidad a través de la construcción de una tabla de contingencia. Estos resultados se han agrupado en la **Tabla V.14.** Como se observa en la tabla, no se obtienen falsos resultados en ninguno de los productos estudiados con *P. aeruginosa,* existiendo concordancia total entre ambos métodos.

A continuación y en tercer lugar, se construyeron las curvas características de funcionamiento del método cuando cada producto estudiado es inoculado con diferentes niveles de *P. aeruginosa*. En efecto, estas curvas representan, para cada producto, la probabilidad de obtener resultados positivos para cada nivel de concentración inicial inoculada de *P. aeruginosa,* permitiéndonos visualizar y evaluar los principales parámetros de calidad **(Figura V.2.)**. Asimismo, en la **Tabla V.15.** se han agrupado los parámetros analíticos de calidad calculados.

Del conjunto de resultados obtenidos, se puede decir que el método de cribado ha mostrado un excelente comportamiento analítico en el estudio de muestras inoculadas con *P. aeruginosa*. El método de cribado ha mostrado una fiabilidad del 100 %, así como una sensibilidad y especificidad máxima. En efecto, el método no ha arrojado falsos negativos, los errores más indeseables debido a que las muestras clasificadas como negativas no se confirman por el método tradicional, siendo esta característica de notable relevancia. Para los productos Ger. y Nel. no se recupera ningún microorganismo demostrando ser autoconservantes a estos niveles de inoculación.

Por otra parte, otro de los resultados más interesantes que puede deducirse de las curvas características de funcionamiento obtenidas y con independencia de la muestra estudiada, es que el método alternativo de cribado permite la detección de un sólo microorganismo (presencia/ausencia) de *P. aeruginosa*/g de producto al 95 % de probabilidad. Este hecho nos indica, en consecuencia, que un valor negativo en estas muestras es sinónimo de ausencia total de *P. aeruginosa* en este tipo de muestras, lo que realza la potencia analítica de este método dado que aunque no diferencia entre patógenos, la ausencia de los mismos lleva implícito la ausencia total de dicho patógeno *P. aeruginosa*.

Tabla V.13. Probabilidades de resultados positivos y negativos para muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *P. aeruginosa.*

Av. Kin.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	326	0	326	0	100
0.3	5	5	0	100	0
0.5	25	25	0	100	0
1.1	20	20	0	100	0
2.1	40	40	0	100	0
4.2	40	40	0	100	0
Lac.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	423	0	423	0	100
0.2	0	0	0	0	100
0.4	0	0	0	0	100
0.9	5	5	0	100	0
1.8	15	15	0	100	0
3.6	30	30	0	100	0
Dnn.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	139	0	139	0	100
0.3	3	3	0	100	0
0.6	6	6	0	100	0
1.1	15	15	0	100	0
2.2	24	24	0	100	0
4.5	24	24	0	100	0

[a] Nivel teórico inoculado (*partiendo del recuento máximo fiable en placa, hasta 250 u.f.c./placa, se realizan diluciones hasta conseguir concentraciones teóricas entre 1 y 5 u.f.c./g de producto de ahí los niveles con decimales*). [b] Número de análisis positivos en el método tradicional, excepto a 0 u.f.c./g que corresponde al número total de análisis efectuados. [c] Número de análisis que arrojaron un valor positivo por el método alternativo. [d] Número de análisis que arrojaron un valor negativo por el método alternativo. [e] Probabilidad de positivos. [f] Probabilidad de negativos.

Tabla V.14. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *P. aeruginosa.*

Av. Kin. (n=456)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Negativos**
Método alternativo	**Positivos**	130 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	326 (VN)
Lac. (n=473)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Negativos**
Método alternativo	**Positivos**	50 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	423 (VN)
Dnn. (n=214)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	75(VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	139 (VN)
Ger. (n=426)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	0 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	426 (VN)
Nel. (n=275)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	0 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	275 (VN)

VP = verdadero positivo, VN = verdadero negativo, FP= falso positivo y FN= falso negativo.

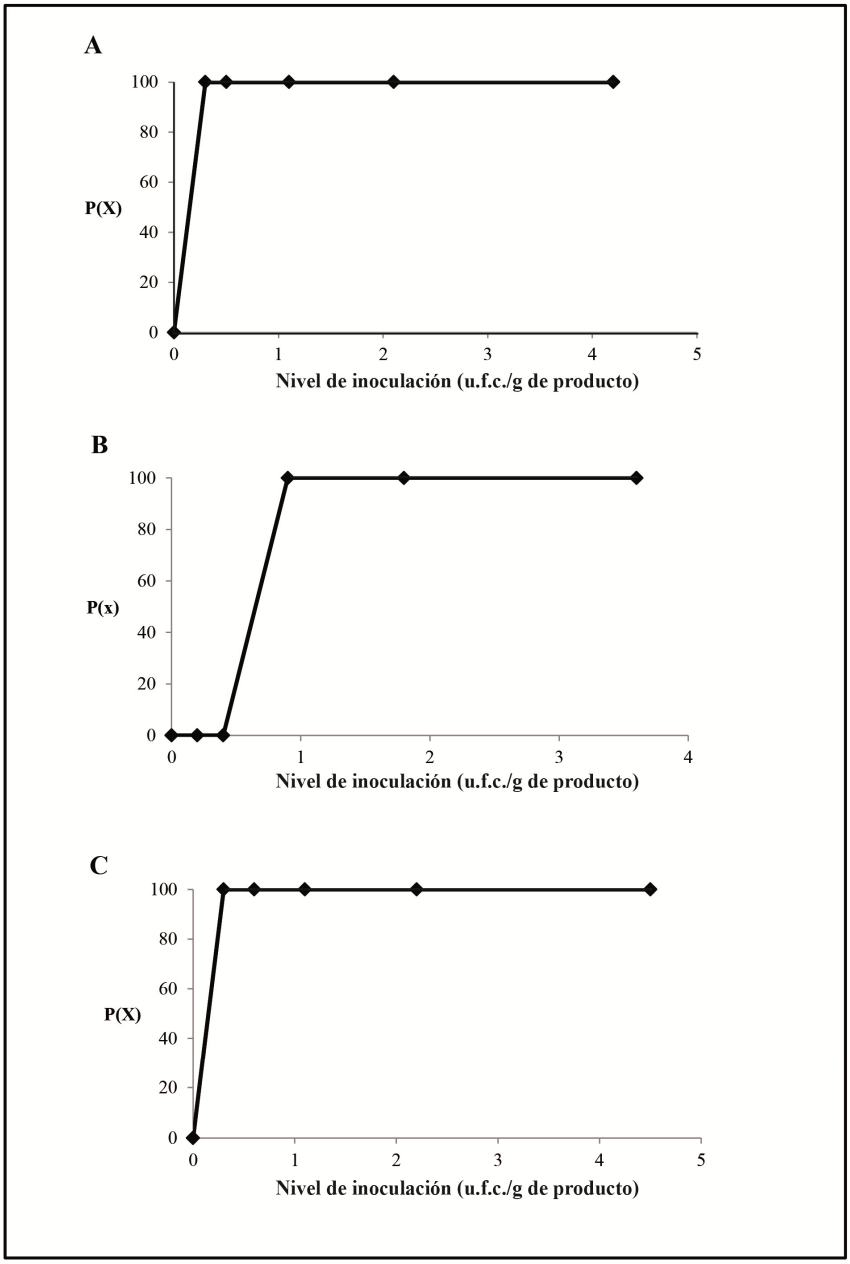

Figura V.2. Curvas características de funcionamiento del método en la detección de *P. aeruginosa* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C).

Tabla V.15. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *P. aeruginosa*.

Muestras	FP[a] (%)	FN[b] (%)	Fiabilidad[c] (%)	Sensibilidad[d]	Especificidad[e]	LOD[f]
Av. Kin.	0	0	100	1	1	1
Lac.	0	0	100	1	1	1
Dnn.	0	0	100	1	1	1

[a] FP (%) = [FP / (VN + FP)] x 100
[b] FN (%) = [FN / (VP + FN)] x 100
[c] Fiabilidad (%) = 100 % – % FP – % FN
[d] Sensibilidad = VP/ (VP + FN) =1 – FN
[e] Especificidad = VN/ (VN + FP) = 1 – FP
[f] Límite de detección (LOD) expresado como el número mínimo de microorganismos detectados/g de producto y obtenido al 95 % de probabilidad.

V.2.3. Estudio analítico de inoculación con *Staphylococcus aureus*

Al igual que con la cepa anterior, se llevaron a cabo inoculaciones controladas comprendidas entre 1 y 11 microorganismos de *Staphylococcus aureus*/g de producto que, constituye otra de las cepas no permitidas según las especificaciones microbiológicas adoptadas en este trabajo de investigación. El estudio se lleva a cabo sobre el mismo conjunto de productos comerciales elegidos y expuestos en la **Tabla V.1.** A continuación, se monitorizaron estas muestras mediante el método de citometría de flujo para estudiar, en primer lugar, y siguiendo el mismo plan desarrollado para *Pseudomonas aeruginosa,* la viabilidad del criterio instrumental de clasificación propuesto. Los resultados correspondientes se han agrupado en las tablas recogidas en el **Anexo VII.4.**

En la **Tabla V.16.** se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los niveles inoculados y para cada una de las muestras analizadas. En dicha tabla, se muestran para cada nivel de inoculación, el número total de análisis realizados, el número de análisis positivos y negativos obtenidos por el método alternativo, así como las probabilidades de cada uno de ellos. Para el producto Av. Kin. se incluyen también los análisis y probabilidades de los resultados dudosos que en esta ocasión, se confirman como positivos por el método tradicional (por ello se han denominado dudosos positivos, DP). Además en la tabla, se ha creído conveniente incluir los resultados obtenidos a 0 u.f.c./g correspondientes al número total de análisis de blancos de reactivos y muestras.

En este caso, se encontraron diferentes comportamientos al inocular *S. aureus* a los distintos productos. En efecto, por una parte, para los productos Lac., Dnn. y Nel., con independencia del nivel de inoculación de *S. aureus,* la respuesta analítica instrumental obtenida fue siempre

superior a 500 contajes/mL, clasificando en consecuencia, todas las muestras como positivas y no encontrando ningún resultado en la zona dudosa.

Por otra parte, un comportamiento similar fue obtenido para el producto Av. Kin. ya que se obtienen contajes superiores a 500 contajes/mL, aunque también hay que destacar que se obtienen resultados en el intervalo de clasificación dudoso para el método alternativo confirmados como positivos por el método tradicional. Probablemente, este hecho sea debido a que el crecimiento de *S. aureus* en el producto Av. Kin. sea más desfavorable que en el resto de matrices estudiadas. Este menor crecimiento hace que algunos resultados caigan dentro del intervalo dudoso. Del estudio de neutralización puede también deducirse este comportamiento, puesto que su recuperación supera tan solo ligeramente el 50 % del criterio de aceptación, al contrario que en el resto de productos estudiados. En consecuencia, en un control de calidad del producto Av. Kin. la obtención de un resultado dudoso conlleva la confirmación del resultado con el método tradicional, mediante la siembra del producto en medio selectivo de *S. aureus*.

De nuevo, al igual que en la cepa *P. aeruginosa,* el producto Ger. no arrojó valores positivos (superiores a 500 contajes/mL) a los niveles de inoculación ensayados. Como se ha indicado anteriormente y en coherencia con los resultados obtenidos en los estudios previos de neutralización del conservante, esto es debido a su propia actividad microbicida, mayor que en el resto de geles estudiados, demostrando que a los niveles estudiados de *S. aureus* el producto es autoconservante.

Además, es preciso señalar que, del conjunto de blancos de reactivos y muestras no inoculadas, todos los resultados obtenidos por el método de

citometría de flujo arrojaron valores inferiores a los 400 contajes/mL, clasificando estas muestras como negativas. Indicar que debido a que en el gel Av. Kin. se incluyen los resultados dudosos obtenidos a nivel cero de inoculación correspondientes a los blancos, para este producto también se obtienen resultados dudosos, todos ellos confirmados como negativos por el método tradicional.

En consecuencia, según el criterio instrumental de clasificación de las muestras establecido inicialmente, éste se mantiene para el producto Av. Kin., incluyendo los resultados dudosos que han de ser confirmados por el método tradicional. Sin embargo para el resto de productos, a la luz de los resultados obtenidos, podría decirse que el criterio instrumental de clasificación en el caso de *S. aureus* se puede simplificar excluyendo a la zona dudosa y que quedaría como sigue:

- >500 contajes/mL resultado positivo
- <500 contajes/mL resultado negativo

En segundo lugar, y una vez comprobada que la viabilidad del criterio instrumental de clasificación proporcionada es adecuada para este producto y esta cepa, se midieron todas las muestras inoculadas por ambos métodos, el alternativo y el tradicional, este último en medio general y selectivo para *S. aureus* en aras de construir la tabla de contingencia (**Tabla V.17).**

Como se observa en la tabla, en el producto Av. Kin. se incluyen los resultados dudosos, siguiendo el criterio instrumental de clasificación inicial de muestras, en el cual se obtienen resultados positivos y negativos al confirmar por el método tradicional. Los resultados dudosos que son positivos por el método tradicional se han denominado dudosos positivos (DP) y si son negativos por el tradicional, dudosos negativos (DN). Este

intervalo de resultados se corresponde con el intervalo de incertidumbre en el criterio instrumental de clasificación de método alternativo.

La aparición de resultados DP, hará que disminuya la fiabilidad del método y el cálculo de su probabilidad se ha hecho acorde a la ecuación:

- DP (%) = [DP / (VP + DP)] x 100

donde: DP, dudosos positivos; VP, verdaderos positivos

Por otra parte, en la tabla se observa la obtención de FP en Lac., aunque se ha de mencionar que se corresponde con un porcentaje despreciable (<1 %) y que éstos no son tan críticos como los FN en el control de calidad de este producto, puesto que ulteriormente son confirmados con el método tradicional y no hay consecuencias para el consumidor.

En el resto de productos estudiados con *S. aureus,* no aparece ningún falso resultado, existiendo concordancia total entre ambos métodos.

La **Figura V.3.** por su parte representa las curvas características de funcionamiento del método, obtenidas en los estudios correspondientes a la inoculación de *S. aureus.* Como puede observarse, en la curva característica de funcionamiento correspondiente a Av. Kin., además de la probabilidad de positivos, se ha representado también la suma de probabilidad de positivos y DP, puesto que son importantes a la hora del control de calidad de este producto e influyen directamente en los resultados de los parámetros de calidad.

Por último, en la **Tabla V.18.** se han agrupado los parámetros analíticos de calidad calculados a partir de los resultados obtenidos en las curvas características.

Para el caso de Av. Kin., se incorpora en la fórmula de la fiabilidad y sensibilidad los resultados DP, puesto que la aparición de estos resultados disminuye ambos parámetros.

Del conjunto de los resultados obtenidos, se puede decir que el método de cribado ha mostrado muy buen comportamiento analítico en el estudio de muestras inoculadas con *S. aureus*. En efecto, el método de cribado ha mostrado una fiabilidad del 100 % con una sensibilidad y especificidad máxima en los productos Dnn. y Nel. En el resto de productos, la fiabilidad disminuye por la aparición de un pequeño porcentaje de FP en el producto Lac. y debido a los resultados DP en Av. Kin.

Cabe destacar que el método no ha arrojado FN, hecho que asegura que un producto en el cual se obtiene resultado negativo es realmente negativo y no saldrá al mercado producto conteniendo *S. aureus*. De nuevo, puede decirse que el criterio instrumental de clasificación de muestras propuesto como hipótesis de partida es adecuado.

Por otra parte, otro de los resultados más interesantes que puede deducirse de las curvas características de funcionamiento obtenidas y con independencia de la muestra estudiada, es que para *S. aureus*, el método alternativo de cribado permite la detección de un sólo microorganismo, si se tiene en consideración los resultados dudosos en el producto Av. Kin. Por tanto, el método detecta la presencia de un microorganismo de *S. aureus* en un gramo de producto al 95 % de probabilidad. Este hecho nos indica que, un valor negativo en estas muestras, es sinónimo de ausencia total de *S. aureus* en este tipo de muestras lo que realza la potencia analítica de este método, debido a que la obtención de un resultado negativo, lleva implícito la ausencia total de dicho patógeno *S. aureus*.

Tabla V.16. Probabilidades de resultados positivos y negativos (y dudosos en el caso de Av. Kin.) en muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *S. aureus.*

Av. Kin.								
(u.f.c./g)[a]	Análisis [b]	Positivos [c]	Negativos [d]	Dudosos [e]	P(X) [f]	N(X) [g]	DP(X) [h]	P(X) + DP(X)[i]
0	239	0	231	8	0	96.6	0	0
0.7	5	5	0	0	100	0	0	100
1.4	20	17	0	3	85	0	15	100
2.7	30	19	0	11	63.3	0	36.7	100
5.5	40	40	0	0	100	0	0	100
11	40	40	0	0	100	0	0	100

Lac.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	Análisis[b]	Positivos[c]	Negativos[d]	P(X)[e]	N(X)[f]
0	303	2	301	**0.6**	99.4
0.4	6	6	0	100	0
0.7	15	15	0	100	0
1.4	24	24	0	100	0
2.7	24	24	0	100	0

Dnn.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	Análisis[b]	Positivos[c]	Negativos[d]	P(X)[e]	N(X)[f]
0	128	0	128	0	100
0.4	12	12	0	100	0
0.7	9	9	0	100	0
1.4	15	15	0	100	0
2.7	24	24	0	100	0

Nel.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	Análisis[b]	Positivos[c]	Negativos[d]	P(X)[e]	N(X)[f]
0	212	0	212	0	100
0.3	6	6	0	100	0
1.4	21	21	0	100	0
2.7	21	21	0	100	0

[a] Nivel teórico inoculado (*partiendo del recuento máximo fiable en placa, hasta 250 u.f.c./placa, se realizan diluciones hasta conseguir concentraciones teóricas entre 1 y 11 u.f.c./g de producto de ahí los niveles con decimales*). [b] Número de análisis positivos en el método tradicional, excepto a 0 u.f.c./g que corresponde al número total de análisis efectuados. [c] Número de análisis que arrojaron un valor positivo por el método alternativo. [d] Número de análisis que arrojaron un valor negativo por el método alternativo. [e] Número de análisis que arrojaron un valor dudoso por el método alternativo. [f] Probabilidad de positivos. [g] Probabilidad de negativos. [h] Probabilidad de dudosos positivos.
Nota: En Nel. para el nivel de inoculación 0.7 u.f.c./g, no se consiguió inocular ningún microorganismo.

Tabla V.17. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *S. aureus.*

* Av. Kin. (n=464)		Método de referencia	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	121 (VP)	0 (FP)
	Dudosos	**14 (DP)**	8 (DN)
	Negativos	0 (FN)	321 (VN)
Lac. (n=372)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	69 (VP)	**2 (FP)**
	Negativos	0 (FN)	301 (VN)
Dnn. (n=203)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	75 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	128 (VN)
Ger. (n=426)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	0 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	426 (VN)
Nel. (n=260)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	48 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	212 (VN)

VP = verdadero positivo, VN = verdadero negativo, FP= falso positivo, FN= falso negativo, DP = dudoso positivo y DN = dudoso negativo. *Para el gel Avena Kinesia, se incluyen los resultados dudosos obtenidos.

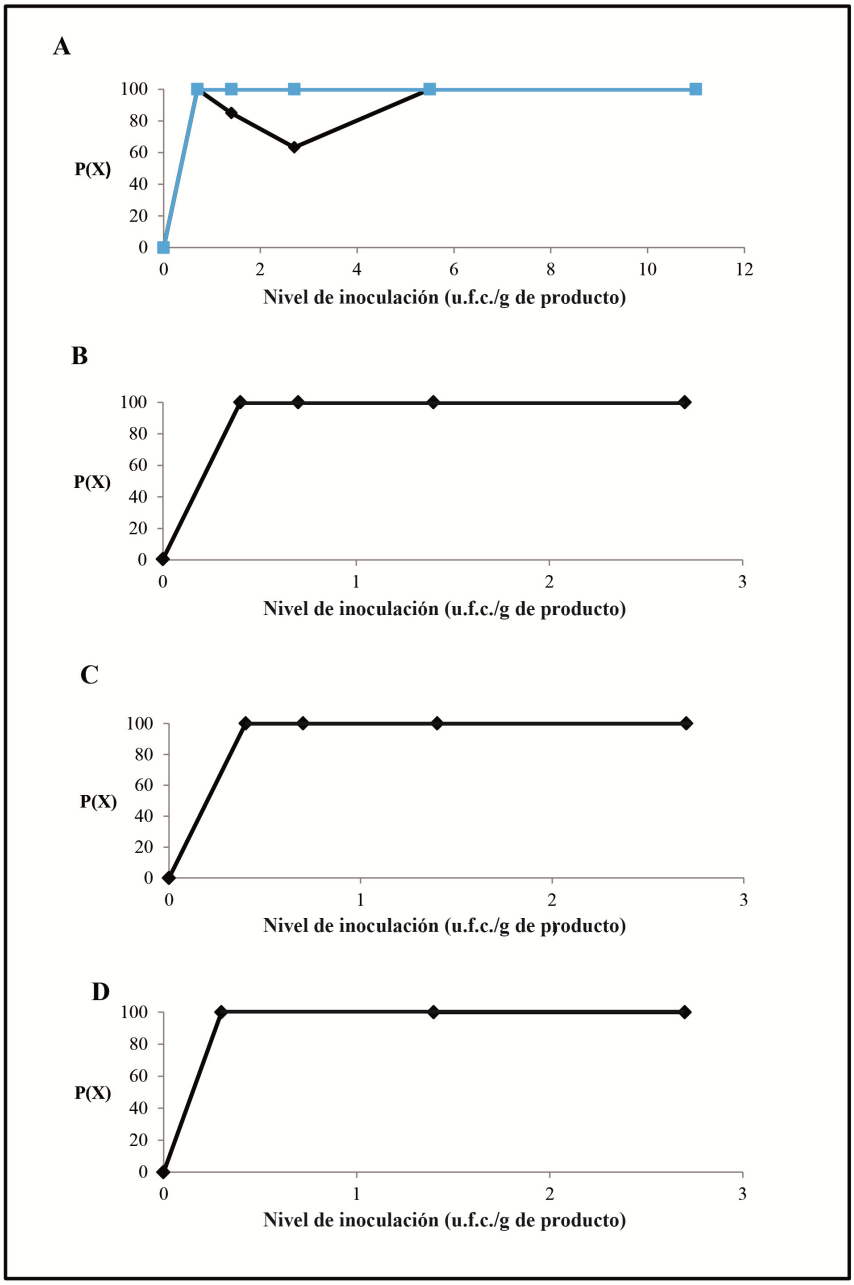

Figura V.3. Curvas características de funcionamiento de método de detección de *S. aureus* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D). —◆— P(X), —■— P(X)+D(X).

Tabla V.18. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado de muestras inoculadas con *S. aureus*.

Muestras	FP[a] (%)	FN[b] (%)	DP[c] (%)	Fiabilidad[d] (%)	Sensib.[e]	Especif.[f]	LOD[g]
Av. Kin.	0	0	10.4	89.6	0.9	1	1*
Lac.	0.6	0	-	99.4	1	0.9	1
Dnn.	0	0	-	100	1	1	1
Nel.	0	0	-	100	1	1	1

[a]FP (%) = [FP / (VN + FP)] x 100
[b]FN (%) = [FN / (VP + FN)] x 100
[c]DP (%) = [DP / (VP + DP)] x 100
[d]Fiabilidad (%) = 100 % - % FP – % FN – % DP
[e]Sensibilidad = VP/ (VP + FN + DP) =1 – FN – DP
[f]Especificidad = VN/ (VN + FP) = 1 – FP
[g]Límite de detección (LOD) expresado como el número mínimo de microorganismos detectados/g de producto y obtenido al 95 % de probabilidad.
*Incluyendo los resultados dudosos

V.2.4. Estudio analítico de inoculación con *Escherichia coli*

A continuación, se estudió el comportamiento de *Escherichia coli* que, como ya se ha indicado precedentemente constituye también una de las cepas no permitidas según las especificaciones microbiológicas e indicadoras de fallo de higiene durante el proceso de fabricación. Para tal fin, se llevaron a cabo también inoculaciones controladas comprendidas entre 1 y 10 microorganismos/g de esta cepa en los productos comerciales elegidos. Los resultados correspondientes a todo el proceso de cribado se han agrupado en las tablas recogidas en el **Anexo VII.5.**

Los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones inoculadas y para cada una de las muestras analizadas se muestran en la **Tabla V.19.** Al igual que en los estudios anteriores, en dicha tabla, se muestra para cada nivel de inoculación, el número total de análisis realizados, el número de análisis positivos y negativos obtenidos por el método alternativo, así como las probabilidades de cada uno de ellos. Para visualizar globalmente los resultados, se ha creído conveniente incluir los resultados de blancos de reactivos y muestras.

Como puede deducirse de la tabla mostrada, se encontraron comportamientos muy similares en todos los productos a excepción hecha de Dnn. En efecto, por una parte, para los productos Av. Kin., Lac., Dnn. y Nel. con independencia del nivel de inoculación de *Escherichia coli,* la respuesta analítica instrumental obtenida fue siempre superior a 500 contajes/mL clasificando en consecuencia todas las muestras como positivas. De nuevo se repitió el comportamiento del producto Ger. que no arrojó valores superiores a 500 contajes/mL en las concentraciones estudiadas y demostrando la autoconservación del producto a esos niveles.

Asimismo, es preciso señalar que, del conjunto de blancos de muestras, todos los resultados obtenidos por el método de citometría de flujo arrojaron valores inferiores a los 400 contajes/mL clasificando estas muestras como negativas.

Según el criterio instrumental de clasificación de muestras establecido inicialmente, se puede simplificar en el caso de *E. coli* con los distintos productos analizados quedando de la siguiente manera:

- >500 contajes/mL resultado positivo
- <500 contajes/mL resultado negativo

Es preciso destacar que para el producto Dnn. a nivel de inoculación de 0.6 microorganismos, aparecen 5 análisis de los 18 realizados, que dan negativo al analizarlos por citometría de flujo y sin embargo se confirman positivos por el método tradicional. Como se verá en la tabla de contingencia **(Tabla V.20)** estos corresponden a FN, los resultados más críticos a la hora de un control de calidad. Estos resultados pueden ser debido, bien a que el crecimiento de *E. coli* durante las 24 horas de incubación no es suficiente para rebasar el límite mínimo de detección en el citómetro de flujo (200 u.f.c./100 µL) o bien debido a un error en la detección del método de citometría de flujo.

También se observa que la correlación de resultados entre ambos métodos en Nel. no es total, debido a la obtención de un FP. Sin embargo, este resultado no es tan crítico, debido a que posteriormente es confirmado por el método tradicional dentro del proceso habitual de control. En el resto de productos estudiados con *E. coli* existe concordancia total entre ambos métodos.

La **Figura V.4.** por su parte representa las curvas características de funcionamiento del método, obtenidas en los estudios correspondientes a la inoculación de *E. coli* a bajas concentraciones. En efecto, estas curvas representan, para cada producto, la probabilidad de obtener resultados positivos para cada nivel de concentración inicial inoculada de este microorganismo, permitiéndonos visualizar y evaluar los principales parámetros de calidad.

Por último, en la **Tabla V.21.** se han agrupado los parámetros analíticos de calidad calculados a partir de los resultados obtenidos y discutidos precedentemente.

Del conjunto de los resultados obtenidos, se puede decir que el método de cribado ha mostrado un buen comportamiento analítico en el estudio de muestras inoculadas con *E. coli*.

En efecto, el método de cribado ha mostrado una fiabilidad del 100 % con una sensibilidad y especificidad máxima en Av. Kin. y Lac. Sin embargo, la fiabilidad y sensibilidad desciende al 95 % en el producto Dnn. al arrojar FN, que son los errores más indeseables debido a que las muestras clasificadas como negativas no se confirman por el método tradicional. También se observa la obtención de FP en Nel. siendo menos críticos, por la confirmación de estos resultados por el método tradicional ulteriormente.

Por otra parte, se detecta la presencia de un microorganismo de *E. coli* en un gramo de producto al 95 % de probabilidad. Este hecho nos indica, en consecuencia que, un valor negativo en estas muestras es sinónimo de ausencia total de *E. coli* en este tipo de muestras, excepto para Dnn. que es necesario realizar el análisis con medio selectivo de *E. coli* para asegurar que no existe ninguno en la muestra debido a la obtención de FN.

Tabla V.19. Probabilidades de resultados positivos y negativos en muestras inoculadas a diferentes niveles de *E. coli.*

Av. Kin.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	321	0	321	0	100
0.6	5	5	0	100	0
1.3	15	15	0	100	0
2.5	40	40	0	100	0
5	40	40	0	100	0
10	40	40	0	100	0
Lac.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	321	0	321	0	100
0.3	15	15	0	100	0
0.6	10	10	0	100	0
1.2	30	30	0	100	0
2.2	30	30	0	100	0
4.5	40	40	0	100	0
Dnn.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	116	0	116	0	100
0.3	12	12	0	100	0
0.6	18	13	5	72.2	27.8
1.2	24	24	0	100	0
2.2	21	21	0	100	0
4.5	24	24	0	100	0
Nel.					
Nivel de inoculación (u.f.c./g)[a]	**Análisis[b]**	**Positivos[c]**	**Negativos[d]**	**P(X)[e]**	**N(X)[f]**
0	200	1	199	0.5	99.5
0.3	6	6	0	100	0
0.6	21	21	0	100	0
1.1	15	15	0	100	0
2.5	18	18	0	100	0
5	24	24	0	100	0

[a] Nivel teórico inoculado (*partiendo del recuento máximo fiable en placa, hasta 250 u.f.c./placa, se realizan diluciones hasta conseguir concentraciones teóricas entre 1 y 10 u.f.c./g de producto de ahí los niveles con decimales*). [b] Número de análisis positivos en el método tradicional, excepto a 0 u.f.c./g que corresponde al número total de análisis efectuados. [c] Número de análisis que arrojaron un valor positivo por el método alternativo. [d] Número de análisis que arrojaron un valor negativo por el método alternativo. [e] Probabilidad de positivos. [f] Probabilidad de negativos.

Tabla V.20. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *E. coli.*

Av. Kin. (n=461)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	140 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	321 (VN)
Lac. (n=446)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	125 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	321 (VN)
Dnn. (n=214)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	93 (VP)	0 (FP)
	Negativos	**5 (FN)**	116 (VN)
Ger. (n=492)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	0 (VP)	0 (FP)
	Negativos	0 (FN)	492 (VN)
Nel. (n=284)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	84 (VP)	**1 (FP)**
	Negativos	0 (FN)	199 (VN)

VP = verdadero positivo, VN = verdadero negativo, FP= falso positivo y FN= falso negativo.

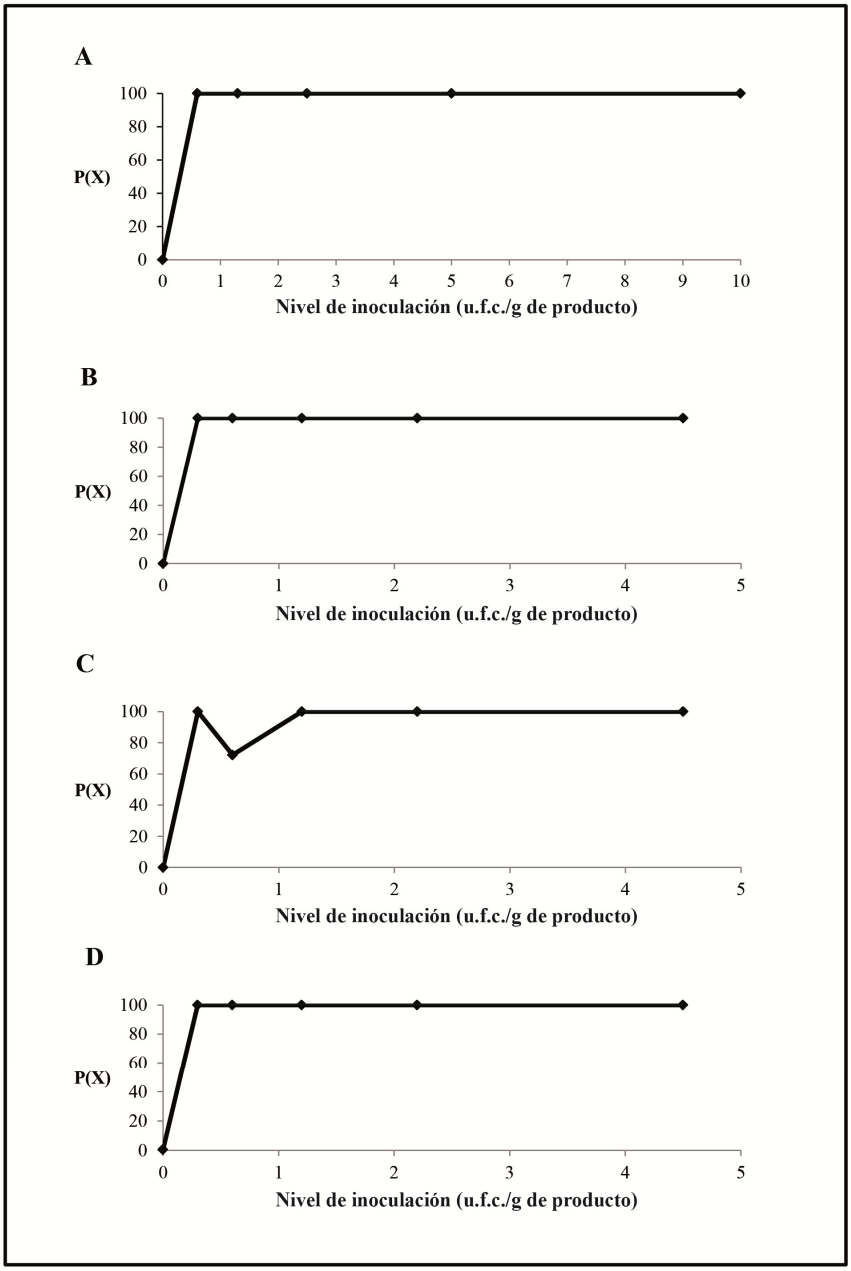

Figura V.4. Curvas características de funcionamiento del método en la detección de *E. coli*. en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D).

Tabla V.21. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *E. coli*.

Muestras	FP[a] (%)	FN[b] (%)	Fiabilidad[c] (%)	Sensibilidad[d]	Especificidad[e]	LOD[f]
Av. Kin.	0	0	100	1	1	1
Lac.	0	0	100	1	1	1
Dnn.	0	5	95	0.95	1	1
Nel.	0.5	0	99.5	1	0.995	1

[a] FP (%) = [FP / (VN + FP)] x 100
[b] FN (%) = [FN / (VP + FN)] x 100
[c] Fiabilidad (%) = 100 % – % FP – % FN
[d] Sensibilidad = VP/ (VP + FN) =1 – FN
[e] Especificidad = VN/ (VN + FP) = 1 – FP
[f] Límite de detección (LOD) expresado como el número mínimo de microorganismos detectados/g de producto y obtenido al 95 % de probabilidad.

V.2.5. Estudio analítico de inoculación con *Candida albicans*

Por último, se estudió el comportamiento de la levadura *Candida albicans* sobre los productos comentados con anterioridad. Igualmente en ellos se llevaron a cabo inoculaciones controladas comprendidas entre 1 y 3 microorganismos de *C. albicans*/g de producto que, como ya se ha indicado precedentemente constituye una de las cepas no deseables según las especificaciones microbiológicas. Los resultados correspondientes se han agrupado en las tablas recogidas en el **Anexo VII.6.**

Los resultados obtenidos para cada uno de los niveles inoculados para esta cepa se muestran en la **Tabla V.22.** En dicha tabla, y al igual que en los casos anteriores, se muestran para cada nivel de inoculación, el número total de análisis, el número de análisis positivos, negativos y dudosos obtenidos por el método alternativo así como las probabilidades de cada uno de ellos. Se ha creído conveniente también incluir los resultados correspondientes al número total de análisis de blancos de reactivos y muestras.

En este tipo de estudios, las muestras cosméticas exhibieron diferentes comportamientos por el método alternativo de citometría de flujo. En los dos primeros niveles de inoculación correspondientes a los más bajos estudiados se han obtenido todo tipo de respuestas tanto negativas, dudosas y positivas, que son positivas por el método tradicional. No es hasta que se alcanza la inoculación de 3 microorganismos/g de producto cuando se obtienen todas las respuestas positivas.

De nuevo, al igual que en las cepas anteriores, el producto Ger. no arrojó valores positivos (superiores a 500 contajes/mL) con las concentraciones estudiadas, ni en comparación con el método tradicional. Como se ha indicado anteriormente y en coherencia con los resultados

obtenidos en los estudios previos de neutralización del conservante, esto es debido a su propia actividad microbicida, mayor que el resto de geles estudiados demostrando que a las concentraciones estudiadas de *C. albicans* el producto es autoconservante.

Asimismo, es preciso señalar que, del conjunto de blancos de reactivos y muestras no inoculadas, todos los resultados obtenidos por el método de citometría de flujo arrojaron valores inferiores a los 400 contajes/mL clasificando estas muestras como negativas y dudosas. Estos resultados son negativos al compararlos con el método tradicional.

Según el criterio instrumental de clasificación de las muestras establecido inicialmente, y a la luz de los resultados obtenidos, podría decirse que el criterio instrumental de clasificación inicial en el caso de *Candida albicans* no se cumple a concentraciones cercanas a un microorganismo. El criterio instrumental de clasificación propuesto inicialmente, se cumple cuando alcanza una concentración de 3 levaduras inoculadas/g de producto.

En segundo lugar, y una vez comprobado la viabilidad del criterio instrumental de clasificación, se midieron todas las muestras inoculadas por ambos métodos, el propuesto y el tradicional, sembrando en medio general y selectivo para *Candida albicans* en aras de construir la tabla de contingencia. Estos resultados se han agrupado en la **Tabla V.23.**

Como se observa en la tabla en los productos estudiados con *C. albicans*, se obtienen FN y resultados DP que harán que disminuya la fiabilidad y sensibilidad del método.

A continuación y en tercer lugar, se construyeron las correspondientes curvas características de funcionamiento del método que se muestran en la **Figura V.5.** En efecto, estas curvas representan, para cada producto, la

probabilidad de obtener resultados positivos y en este caso también dudosos, para cada nivel de concentración inicial inoculada de *C. albicans,* permitiéndonos visualizar y evaluar los principales parámetros de calidad.

Por último, en la **Tabla V.24.** se han agrupado los parámetros analíticos de calidad, calculados a partir de los resultados obtenidos y discutidos precedentemente.

Del conjunto de los resultados obtenidos, se puede decir que el método de cribado ha mostrado peor comportamiento analítico en el estudio de muestras inoculadas con *C. albicans,* en comparación con el resto de bacterias anteriormente estudiadas. Esto es debido a que el método ha arrojado FN y resultados DP que harán que los resultados que se obtienen en un control de calidad no sean fiables.

Con el criterio instrumental de clasificación de muestras propuesto como hipótesis, sólo se puede garantizar que cuando se obtiene un resultado positivo por el método de citometría de flujo, existen inicialmente al menos 3 microorganismos de *C. albicans*/g de producto. Si incorporamos los valores dudosos como positivos en el criterio instrumental de clasificación de las muestras, el límite de detección disminuye a 1,5 microorganismos/g de producto, pero aun así es insuficiente para asegurar la presencia/ausencia de *C. albicans* en un gramo de producto, puesto que se obtienen valores positivos en la zona de resultados negativos. Por tanto, a la hora del control de calidad de los productos cosméticos, es necesario realizar el análisis de *Candida albicans* mediante la siembra en medio selectivo de esta cepa por el método tradicional.

La causa principal de la obtención de FN y DP, es debido a las características intrínsecas de esta levadura. *Candida albicans* posee un crecimiento más lento que el resto de bacterias estudiadas. Simplemente, si observamos el procedimiento del método tradicional, para las bacterias estudiadas sólo es necesario un tiempo de incubación de 3 días, sin embargo para *Candida albicans* se necesitan de 5 a 7 días de incubación para conseguir su visualización en placa. Por tanto, las 24 horas de incubación establecidas en el procedimiento del método de citometría de flujo, no parecen suficientes para conseguir la proliferación necesaria para la detección en el citómetro de flujo con el criterio de clasificación inicial propuesto.

Como parte de la investigación para estudios futuros, éste sería un objetivo a establecer, averiguar el tiempo de incubación necesario para la detección de *Candida albicans* con el criterio de aceptación establecido en idénticas condiciones. Otro enfoque del estudio, sería intentar acelerar el crecimiento de *Candida albicans* para así, detectarlo en el mismo tiempo de incubación establecido de 24 horas y que cumpla con el criterio de clasificación de las muestras propuesto.

Tabla V.22. Probabilidades de resultados positivos, negativos y dudosos en muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *C. albicans.*

Av. Kin.								
(u.f.c./g) [a]	**Análisis** [b]	**Positivo** [c]	**Negativos** [d]	**Dudoso** [e]	**P(X)** [f]	**N(X)** [g]	**DP(X)** [h]	**P(X) + DP(X)** [i]
0	261	0	231	30	0	85.5	0	0
0.4	40	5	6	29	12.5	15	72.5	85
0.7	40	14	7	19	35	17.5	47.5	82.5
1.5	40	37	0	3	92.5	0	7.5	100
2.9	40	40	0	0	100	0	0	100
Lac.								
(u.f.c./g) [a]	**Análisis** [b]	**Positivo** [c]	**Negativos** [d]	**Dudoso** [e]	**P(X)** [f]	**N(X)** [g]	**DP(X)** [h]	**P(X) + DP(X)** [i]
0	261	0	231	30	0	85.5	0	0
0.4	40	5	4	31	12.5	10	77.5	90
0.7	40	15	5	20	37.5	12.5	50	87.5
1.5	40	40	0	0	100	0	0	100
2.9	40	40	0	0	100	0	0	100
Dnn.								
(u.f.c./g) [a]	**Análisis** [b]	**Positivo** [c]	**Negativos** [d]	**Dudoso** [e]	**P(X)** [f]	**N(X)** [g]	**DP(X)** [h]	**P(X) + DP(X)** [i]
0	261	0	231	30	0	85.5	0	0
0.4	40	4	5	31	10	12.5	77.5	85
0.7	40	18	5	17	45	12.5	42.5	87.5
1.5	40	35	0	5	87.5	0	12.5	100
2.9	40	40	0	0	100	0	0	100
Nel.								
(u.f.c./g[a] [a]	**Análisis** [b]	**Positivo** [c]	**Negativos** [d]	**Dudoso** [e]	**P(X)** [f]	**N(X)** [g]	**DP(X)** [h]	**P(X) + DP(X)** [i]
0	261	0	231	30	0	85.5	0	0
0.4	40	0	10	30	0	25	75	75
0.7	40	10	5	20	25	12.5	50	75
1.5	40	30	0	10	75	0	25	100
2.9	40	40	0	0	100	0	0	100

[a] Nivel teórico inoculado (*partiendo del recuento máximo fiable en placa, hasta 250 u.f.c./placa, se realizan diluciones hasta conseguir concentraciones teóricas entre 1 y 3 u.f.c./g de producto de ahí los niveles con decimales*). [b] Número de análisis positivos en el método tradicional, excepto a 0 u.f.c./g que corresponde al número total de análisis efectuados. [c] Número de análisis que arrojaron un valor positivo por el método alternativo. [d] Número de análisis que arrojaron un valor negativo por el método alternativo. [e] Número de análisis que arrojaron un valor dudoso por el método alternativo. [f] Probabilidad de positivos. [g] Probabilidad de negativos. [h] Probabilidad de dudosos positivos. [i] Suma de probabilidad de positivos y dudosos positivos.

Tabla V.23. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *C. albicans.*

Av. Kin. (n=421)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	96 (VP)	0 (FP)
	Dudosos	**51 (DP)**	30 (DN)
	Negativos	**13 (FN)**	231 (VN)
Lac. (n=421)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	100 (VP)	0 (FP)
	Dudosos	**51 (DP)**	30 (DN)
	Negativos	**9 (FN)**	231 (VN)
Dnn. (n=422)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	98 (VP)	0 (FP)
	Dudosos	**53 (DP)**	30 (DN)
	Negativos	**10 (FN)**	231 (VN)
Nel. (n=416)		**Método de referencia**	
		Positivos	**Positivos**
Método alternativo	**Positivos**	80 (VP)	0 (FP)
	Dudosos	**60 (DP)**	30 (DN)
	Negativos	**15 (FN)**	231 (VN)

VP= verdadero positivo, VN = verdadero negativo, FP= falso positivo, FN= falso negativo, DP = dudoso positivo y DN = dudoso negativo.

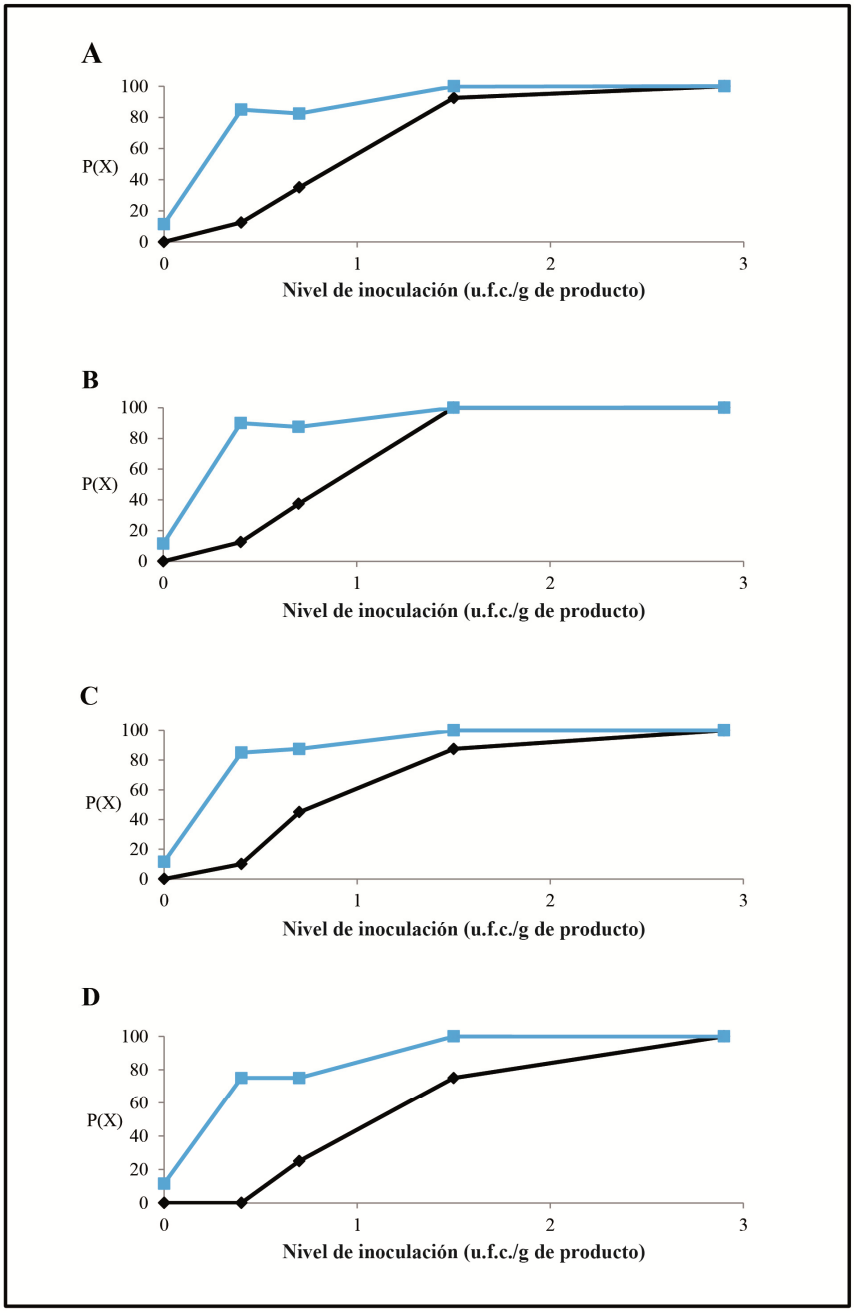

Figura V.5. Curvas características de funcionamiento de método en la detección de *C. albicans* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D). —•— P(X), —■— P(X)+D(X).

Tabla V.24. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *C. albicans*.

Muestras	FP[a] (%)	FN[b] (%)	DP[c] (%)	Fiabilidad[d] (%)	Sensib.[e]	Especif.[f]	LOD[g]
Av. Kin.	0	11.9	34.7	53.4	0.6	1	3
Lac.	0	9.1	33.7	57.2	0.6	1	1.5
Dnn.	0	9.2	35.1	55.7	0.6	1	3
Nel.	0	15.8	42.8	41.4	0.5	1	3

[a]FP (%) = [FP / (VN + FP)] x 100
[b]FN (%) = [FN / (VP + FN)] x 100
[c]DP (%) = [DP / (VP + DP)] x 100
[d]Fiabilidad (%) = 100 % - % FP – % FN – % DP
[e]Sensibilidad = VP/ (VP + FN + DP) =1 – FN – DP
[f]Especificidad = VN/ (VN + FP) = 1 – FP
[g]Límite de detección (LOD) expresado como el número mínimo de microorganismos detectados/g de producto y obtenido al 95 % de probabilidad.

V.3. Análisis de productos cosméticos comerciales. *Test* de equivalencia

En la última etapa de investigación de esta Tesis Doctoral, se estudió la viabilidad del método alternativo de cribado basado en citometría de flujo con detección fluorimétrica, para el análisis de productos cosméticos comerciales obtenidos de la fabricación de Antonio Puig S.A. para su comercialización externa.

Además del estudio de las características analíticas del método con las cepas no permitidas, resulta necesario demostrar también que el método alternativo a utilizar es equivalente al menos al método tradicional para el uso previsto tal y como se expone en la bibliografía referenciada [9 - 12]. Esto implica que la calidad analítica de los resultados obtenidos por el método alternativo sea igual o superior a la calidad analítica de los resultados obtenidos por el método tradicional. Con este estudio, también se pretende evaluar el comportamiento del método alternativo frente a otras cepas distintas a las no permitidas.

Para llevar a cabo estos estudios, debe realizarse un estudio comparativo entre el método alternativo y el método tradicional. El número de muestras necesario para llevar a cabo esta comparación y el período de prueba durante el cual debe realizarse, no está contemplado para muestras cosméticas en la bibliografía. Aunque sí se refleja la necesidad de asegurar en todos los casos la representatividad de todo el material del proceso y la realización de la evaluación estadística [9 - 12].

La representatividad de la muestras se asegura en cada una de ellas, mediante un procedimiento estandarizado que incluye la homogenización del producto, la eliminación o descarte del primer volumen de producto

(del orden de unos cuantos mL) y la extracción de la muestra en ambiente estéril.

El número de geles de baño evaluados en este estudio es de 38 (incluidos los 5 estudiados en la evaluación de parámetros críticos de calidad). Los geles nuevos tienen matrices muy similares a los elegidos anteriormente y, por tanto, su comportamiento es extrapolable. Los productos estudiados se han detallado en la **Tabla IV.1.** de la parte experimental.

En la tabla de contingencia (**Tabla V.25.**), se muestran los resultados obtenidos en la comparación de ambos métodos para el conjunto de muestras analizadas.

Como puede observarse, los resultados son excelentes, debido a que se obtiene un 88 % de resultados equivalentes entre ambos métodos que corresponden a VN demostrando la calidad de los productos analizados. También existe una correspondencia total entre los VP de ambos métodos, poniendo de nuevo de manifiesto la excelente calidad de los productos estudiados. Además, el método alternativo de cribado estuvo exento de FN, los resultados más críticos, puesto que no se confirman ulteriormente por el método tradicional en el control de calidad de los productos.

Sin embargo, el método alternativo genera un 8 % de FP (resultados positivos por el método alternativo que se confirman como negativos en el método tradicional).

Por una parte, estos resultados pueden ser debidos al distinto límite de detección que tienen ambos métodos. En efecto, en el método alternativo de citometría de flujo el límite de detección está muy próximo a 1 u.f.c./g, excepto para *Candida albicans* que es de 3 u.f.c./g, como se ha demostrado en el estudio de los parámetros de calidad, debido al período

de incubación de 24 horas que permite la proliferación de los microorganismos; mientras que en el método tradicional, el límite de detección es de 100 u.f.c./g de producto, ya que el producto es diluido 100 veces y los 30 minutos de espera son sólo para neutralizar el conservante. Por otra parte, esta discrepancia puede entenderse debido a que el método por citometría de flujo puede detectar microorganismos viables pero no cultivables o estresados y así obtener más resultados positivos, considerándose una mejora en la calidad de los análisis al emplear este método.

Para averiguar el verdadero origen de estos resultados discrepantes entre métodos, se llevaron a cabo otra serie de estudios que se describirán y discutirán a continuación.

Tabla V.25. Tabla de contingencia resultante de la comparación del método alternativo y método tradicional en el análisis de muestras cosméticas comerciales.

Muestras (n=5152)		**Método de referencia**			
		Positivos		**Negativos**	
		Análisis	**P(%)[a]**	**Análisis**	**P(%)[a]**
Método alternativo	**Positivos**	0 (VP)	0	**397 (FP)**	**8**
	Dudosos	0 (DP)	0	228 (DN)	4
	Negativos	0 (FN)	0	4527 (VN)	88

VP= verdadero positivo, VN = verdadero negativo, FP= falso positivo, FN= falso negativo, DP = dudoso positivo y DN = dudoso negativo. [a] P(%) se define como el porcentaje de correspondencia entre ambos métodos.

V.3.1. Estudio de muestras positivas por el método alternativo y confirmadas como negativas por el método tradicional

En aras de extraer más información sobre las muestras clasificadas como positivas por el método alternativo, pero confirmadas como negativas por el método tradicional, se llevó a cabo otra siembra en placa, adicional a la del método tradicional cosmético, en idénticas condiciones a las empleadas en el método alternativo de cribado (la siembra se realiza después de haber seguido el protocolo de diluir el producto 1:100 p/p en caldo de cultivo e incubar la muestra durante 24 horas a 32.5 ± 2.5 ºC). Es importante indicar que nos referiremos a estos resultados como *resultados obtenidos en placa bajo condiciones de cultivo de citómetro de flujo (condiciones método alternativo).*

El objetivo de esta siembra adicional, es comprobar si realmente el resultado positivo obtenido por el método de citometría de flujo es realmente positivo en el medio de cultivo. Si los resultados obtenidos son positivos, entonces este hecho será debido al límite de detección inferior del método tradicional. Por el contrario, si los resultados son negativos, puede ser debido, bien a que el instrumento detecta erróneamente clasificando los resultados en positivos, o bien, la instrumentación es capaz de detectar microorganismos que por el método tradicional no se detectan, es decir, microorganismos viables pero no cultivables. Este último hecho convierte a estos resultados en FP.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla V.26.** Del conjunto de estos resultados, se puede decir que existe una correspondencia muy alta de resultados positivos obtenidos por el método alternativo y la placa adicional (95 %). Este hecho es muy importante porque confirma que el método alternativo es capaz de detectar a niveles inferiores que los que detecta el método tradicional (método oficial).

El 5 % restante corresponde a resultados no equivalentes entre ambos métodos (resultado positivo en el método alternativo y negativo en placa adicional). Sin embargo, se observa que de estas 22 muestras, en 17 de ellas, los resultados positivos coinciden con muestras que dentro de la secuencia de análisis, están posicionadas posteriormente a resultados positivos. Este hecho revela una contaminación cruzada o residual en el análisis de una muestra situada después de un análisis con resultado positivo, denominado "*crossing over*". Si se corrige este efecto, mediante el aumento de limpieza entre muestras, el porcentaje de resultados no equivalentes entre ambos métodos, se reduce a tan sólo 1 %.

Este porcentaje final corresponde a resultados positivos obtenidos por el método alternativo de cribado pero confirmados como resultados negativos en placa (empleando las condiciones del citómetro de flujo). En consecuencia, estos resultados son los únicos que se corresponden con FP, bien por la detección equívoca del método, o bien, por la detección del método de citometría de flujo de microorganismos viables pero no cultivables, mejorando la calidad de los análisis por el método alternativo, al no depender de las limitaciones de los medios de cultivo, ni de la temperatura para su detección.

El conjunto de estos resultados pusieron de manifiesto que el método alternativo resulta, no sólo equivalente al tradicional, sino que, incluso exhibe un comportamiento analítico mejorado para la detección de microorganismos.

Tabla V.26. Tabla de contingencia comparativa entre resultados positivos por el método alternativo y por siembra en placa en idénticas condiciones experimentales.

Muestras (n=397)		**Método en placa [a]**		
		Positivos	**Negativos**	
Método alternativo	**Positivos**	375 (95 %)	22 (5 %)	
			17 *crossing over* (4 %)	5 (1 %)

[a] Condiciones empleadas en el método alternativo

V.3.2. Estudio de muestras dudosas por el método alternativo y confirmadas como negativas por el método tradicional

Al igual que para las muestras positivas, se llevó a cabo el mismo estudio para las muestras dudosas, muestras que arrojaron resultados clasificados como dudosos por el método alternativo pero confirmados como negativos por el método tradicional. Se realizó otra siembra en placa adicional a la del método tradicional, en condiciones idénticas a la muestra analizada por el método alternativo de cribado. La **Tabla V.27.** agrupa los resultados obtenidos en este tipo de estudios.

Como se observa, un porcentaje muy elevado de las muestras dudosas por el método alternativo (84 %) se confirman negativas cuando se analizan en placa en idénticas condiciones que el método alternativo. Adicionalmente, de entre todos los resultados negativos, el 17 % que aparecen son debidos a contaminación cruzada procedente de la muestra anterior positiva en la secuencia realizada *("crossing over"*) y que resultan dudosas en la siguiente, revelando una contaminación residual, que se corrige aumentando la limpieza entre muestras.

Sin embargo, de estas muestras dudosas por el método alternativo hay un 16 % que se confirman positivas en placa (condiciones método alternativo), siendo una mejora del método alternativo respecto al método tradicional, ya que estos microorganismos no se detectan en el método tradicional cosmético oficial.

Sin embargo, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de los parámetros analíticos relacionados con la inoculación de las cepas no permitidas según especificaciones, podría deducirse que en el caso de la aparición de un resultado dudoso, este no se correspondería con la presencia ni de *P. aeruginosa*, ni *S. aureus*, ni *E. coli*, teniéndose que

descartar tan solo que no hubiese presencia de *C. albicans, (*ni *E. coli* en el caso de que fuera con Dnn.). En el método tradicional estas muestras se darían como buenas por obtener resultado negativo, sin embargo contienen carga microbiana.

Tabla V.27. Tabla de contingencia comparativa entre resultados dudosos por el método alternativo y por siembra en placa en idénticas condiciones experimentales.

Muestras (n=228)		**Método en placa [a]**		
		Positivos	**Negativos**	
Método alternativo	**Dudosos**	36 (16 %)	192 (84 %)	
			39 *crossing over* (17 %)	153 (67 %)

[a] Condiciones empleadas en el método alternativo

V.4. Evaluación del tiempo de análisis

Finalmente, el último punto respecto al cumplimiento del uso previsto consiste en la evaluación del tiempo que se emplea en la obtención de resultados por el método alternativo de citometría de flujo respecto al establecido por el método tradicional. El tiempo de análisis es uno de los factores considerados dentro del parámetro de calidad de productividad.

En el método tradicional, en el mejor de los casos (todos los resultados correctos), la duración de los análisis es de 5 días. Sin embargo, el tiempo empleado usando el método alternativo es de 2 días, por lo que en el análisis del método alternativo se emplea un 60 % menos de tiempo que el empleado en el método tradicional.

Para los patógenos no permitidos por la especificaciones, se observa que para las bacterias estudiadas: *P. aeruginosa, S. aureus* y *E. coli* (salvo *E. coli* con Dnn.) se cumple este ahorro de tiempo en el análisis puesto que un resultado negativo del método alternativo garantiza la ausencia de microorganismos y los patógenos mencionados. Sin embargo, no es así para la levadura *C. albicans* al ser necesario la siembra del producto usando la forma tradicional de siembra en placa.

V.5. Referencias bibliográficas

[1] Microbial recovery by using neutralizing media, Journal of Hygiene Sciences, (2008) 7- 8.

[2] H. Mehrgan, F. Elmi, M. R. Fazeli, A. R. Shahverdi, and N. Samadi, Evaluation of neutralizing efficacy and Possible Microbial Cell Toxicity of a Universal Neutralizer proposed by the CTPA, Iranian Journal of Pharmaceutica Research, 3 (2006) 173-178.

[3] 2.6.12. Microbiological examination of non-sterile products: total viable aerobic count, European Pharmacopoeia 5.6. (2006) 166 – 172.

[4] Flow Cytometry, 2.7.24., European Pharmacopoeia 5.6. (2006) 4423 – 4425.

[5] S. Antúnez, Mª D. González, P. Lombarte, F. Niubó, MªP. Oliver, R. Ortega, M. Prats, Validación del método de control de la contaminación microbiana en productos no obligatoriamente estériles, Monografías AEFI (Sección catalana), 1993.

[6] E. Trullols, I. Ruisánchez, F. X. Rius, Validation of qualitative analytical methods, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 137 – 145.

[7] A. Ríos, H. Téllez, Reliability of binary analytical responses Trends Anal. Chem. 24 (2006) 609-616.

[8] A. Rios, R. Compañó, Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos, Editorial síntesis (2010) 211 – 264.

[9] Fitness for purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv, 2014.

[10] El reto de la industria cosmética: Conservación segura, eficaz y universal, Seminario Schülke & Mayr, 2007.

[11] Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005.

[12] E. Iañez, Curso de Microbiología General, fai.unne.edu.ar/biologia/micro**general**/micro-**ianez**/index.html, 2005.

VI. Conclusiones

A continuación, se describen las conclusiones generales obtenidas en esta Tesis Doctoral durante el estudio de la validación analítica del método propuesto de citometría de flujo con detección por fluorescencia para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de productos cosméticos comerciales.

1- A pesar de la ambigüedad existente en la bibliografía, se han identificado y definido los parámetros analíticos de calidad de los métodos cualitativos en el ámbito de la microbiología.

2- Se han identificado y definido tanto el uso previsto del método propuesto (*el cumplimiento de las especificaciones cosméticas y la obtención de resultados de igual o mejor calidad en un tiempo menor que el establecido por el método tradicional*), como los parámetros analíticos de calidad críticos (falsos resultados, fiabilidad, no fiabilidad, sensibilidad, especificidad y límite de detección) que aseguran alcanzar dicho uso.

3- Se han encontrado unas condiciones óptimas de neutralización química y por dilución de los conservantes para todos los productos cosméticos estudiados (dilución del conservante de 1:100 p/p durante un tiempo de actuación de 30 min.). Estos resultados han sido de extraordinaria importancia dado que han permitido llevar a cabo con fiabilidad los estudios de validación analítica del método propuesto.

4- La evaluación de los parámetros de calidad (falsos resultados, fiabilidad, no fiabilidad, sensibilidad y especificidad) llevada a cabo tanto en los estudios de los blancos como en los estudios de inoculación individual de las muestras de geles para todas las cepas prohibidas (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Candida albicans)*, ha permitido demostrar la pertinencia y viabilidad del

criterio instrumental de clasificación de muestras cosméticas (propuesto por el proveedor). Asimismo, se ha podido simplificar dicho criterio de clasificación instrumental en la detección de estos patógenos con excepción hecha de *Candida albicans.*

5- La evaluación del límite de detección llevada a cabo en los estudios de inoculación individual de las muestras de geles para todas las cepas prohibidas ha demostrado que la capacidad de detección del método permite asegurar ausencia de patógenos no deseados en todos los casos examinados excepto para la levadura *C. albicans*.

6- Se ha demostrado que el método propuesto es válido para el análisis de todos productos cosméticos comerciales debido a que cumple con especificaciones en un tiempo de análisis menor (excepto para *C. albicans*) generando resultados de igual o superior calidad analítica a los obtenidos por el método tradicional (determinación de microorganismos viables pero no cultivables), permitiendo por ello el aseguramiento de la calidad microbiológica de los todos los productos cosméticos comerciales.

Por todo ello, y con la sola excepción de la detección de *C. albicans*, se puede concluir que se ha llevado a cabo con éxito la validación analítica de un método cualitativo rápido de cribado de muestras, mediante citometría de flujo con detección por fluorescencia para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de los productos cosméticos comercializados por Antonio Puig S.A.

Conclusions

General conclusions obtained in this Doctoral Thesis during the study of the analytical validation of a proposed flow cytometry method by fluorescence detection to carry out control of microbiological quality of cosmetic commercial products are described.

1- Despite the existing ambiguity in bibliography, quality analytical parameters of qualitative methods in the area of microbiology have been identified and defined.

2- The fitness for purpose of the proposed method has been identified and defined (*to obtain cosmetic specifications compliance and identical or even better quality results in less time than the established for the traditional method*), as well as the critical quality analytical parameters (false results, reliability, not reliability, sensitivity, specificity and limit of detection) that assure the above mentioned use is reached.

3- Optimal conditions for chemical and dilution neutralization of preservatives have been found for all the studied cosmetic products (1:100 (w/w) preservative dilution during 30 min.). These results have been remarkably important because they have allowed carrying out with reliability the studies of analytical validation of the proposed method.

4- The evaluation of the quality parameters (false results, reliability, not reliability, sensitivity and specificity) carried out in blanks studies and also in shower gel samples studies by individual inoculation of undesired pathogens (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Candida albicans*), has allowed to demonstrate the suitability and viability of the instrumental criterion of classification in cosmetic samples (provided by the supplier). Likewise, the mentioned instrumental classification criterion has been simplified for these pathogens detection except for *Candida albicans*.

5- The detection limit evaluation, carried out in individual inoculation studies within shower gels samples for all the banned pathogens, has demonstrated that the method detection capacity allows assuring the absence of undesired pathogens in all examined cases, except for *C. albicans* yeast.

6- It has been demonstrated that the proposed method is valid for the analysis of all cosmetic commercial products due to the fact that cosmetic specifications are accomplished in less time (except for *C. albicans*), generating equal or even better analytical quality results than the traditional method (determination of viable but non culturable microorganisms), assuring the microbiological quality of all the cosmetic commercial products studied.

Therefore, with the only exception of *C. albicans* detection, it is possible to conclude that analytical validation of a qualitative rapid method of screening of samples using flow cytometry by fluorescence detection to carry out the control of microbiological quality of the cosmetic products commercialized by Antonio Puig S.A. has been carried out successfully.

MAVT	Microorganismos aerobios viables totales
UFC	Unidades formadoras de colonias
RMM	*Rapid Microbiological Methods*
PAT	*Process Analytical Technology*
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
ATP	Adenosina trifosfato
URL	Unidades relativas de luz
ADP	Adenosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assays*
MALDI-TOF	*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	*Polymerase chain reaction*
ARN	Ácido ribonucleico
cADN	Ácido desoxirribonucleico cíclico
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
ISO	*International Organization for Standardization*
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
CRM	*Certificate Reference Material*
RSDs	*Relative Standard Deviation*
FP	Falso positivo
FN	Falso negativo
VP	Verdadero positivo
VN	Verdadero negativo
CECT	Cepas Españolas de Colección Tipo
ATCC	*American Types Culture Collection*
TSA	Agar triptona soja deshidratado
SB	Agar Sabouraud
TSB	Caldo triptona soja
Av. Kin.	Gel Avena Kinesia
Lac.	Gel Lactovit
Dnn.	Jabón Líquido Muy Suave Denenes
Ger.	Germisdín
Nel.	Gel Nelia Hidratante
DP	Dudoso positivo
DN	Dudoso negativo
LOD	Límite de detección

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Esquema de la detección por fluorescencia en citometría de flujo. 50

Figura III.1. Sistema de cribado o *screening* para análisis de muestras microbiológicas. 70

Figura III.2. Zonas de fiabilidad y no-fiabilidad. 79

Figura III.3. Curva característica de funcionamiento para el cribado de muestras que contienen aflatoxinas B1. 86

Figura V.1. Porcentaje de resultados negativos obtenidos en los blancos de reactivo y en los blancos de muestra para cada uno de los productos estudiados. 129

Figura V.2. Curvas características de funcionamiento del método en la detección de *P. aeruginosa* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C). 136

Figura V.3. Curvas características de funcionamiento de método de detección de *S. aureus* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D). —•— P(X), -■- P(X)+D(X). 145

Figura V.4. Curvas características de funcionamiento del método en la detección de *E. coli*. en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D). 152

Figura V.5. Curvas características de funcionamiento de método en la detección de *C. albicans* en muestras inoculadas de Av. Kin. (A), Lac. (B) y Dnn. (C) y Nel (D). —•— P(X), -■- P(X)+D(X). 160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1. Especificaciones microbiológicas cosméticas. 29

Tabla III.1. Tabla de contingencia correspondiente a la comparación entre el método alternativo y el método de referencia. 77

Tabla IV.1. Productos utilizados para el *test* de equivalencia entre el método tradicional y alternativo. 94

Tabla V.1. Geles y conservantes empleados en los estudios de neutralización. 116

Tabla V.2. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Av. Kin. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 119

Tabla V.3. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Lac. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 120

Tabla V.4. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Dnn. en las distintas cepas estudiadas y sembradasa distintos tiempos. 120

Tabla V.5. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Ger. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 121

Tabla V.6. Estudios de neutralización química y por dilución 1/10 (p/p) del conservante para Nel. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 121

Tabla V.7. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Av. Kin. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 122

Tabla V.8. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Lac. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 123

Tabla V.9. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Dnn. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 123

Tabla V.10. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Ger. **e**n las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 124

Tabla V.11. Estudios de neutralización química y por dilución 1/100 (p/p) del conservante para Nel. en las distintas cepas estudiadas y sembradas a distintos tiempos. 124

Tabla V.12. Criterio instrumental de clasificación de las muestras aceptado durante el control de calidad de productos cosméticos, empleando el método alternativo de citometría de flujo con detección fluorimétrica. 127

Tabla V.13. Probabilidades de resultados positivos y negativos para muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *P. aeruginosa.* 134

Tabla V.14. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *P. aeruginosa.* 135

Tabla V.15. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *P. aeruginosa*. 137

Tabla V.16. Probabilidades de resultados positivos y negativos (y dudosos en el caso de Av. Kin.) para muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *S. aureus.* 143

Tabla V.17. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *S. aureus.* 144

Tabla V.18. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado de muestras inoculadas con *S. aureus*. 146

Tabla V.19. Probabilidades de resultados positivos y negativos para muestras inoculadas a diferentes niveles de *E. coli.* 150

Tabla V.20. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *E. coli.* 151

Tabla V.21. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *E. coli*. 153

Tabla V.22. Probabilidades de resultados positivos, negativos y dudosos para muestras cosméticas inoculadas a diferentes niveles de *C. albicans.* 158

Tabla V.23. Tabla de contingencia correspondiente a muestras cosméticas inoculadas con *C. albicans.* 159

Tabla V.24. Parámetros de calidad del método alternativo de cribado en muestras inoculadas con *C. albicans*. 161

Tabla V.25. Tabla de contingencia resultante de la comparación del método alternativo y método tradicional en el análisis de muestras cosméticas comerciales. 164

Tabla V.26. Tabla de contingencia comparativa entre resultados positivos por el método alternativo y por siembra en placa en idénticas condiciones experimentales. 167

Tabla V.27. Tabla de contingencia comparativa entre resultados dudosos por el método alternativo y por siembra en placa en idénticas condiciones experimentales. 169

ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXO

Tabla VII.1.1. Datos obtenidos por el método alternativo durante la monitorización de blancos de reactivo. 185

Tabla VII.2.1. Datos obtenidos por el método alternativo durante la monitorización del caldo de cultivo y Av. Kin. 187

Tabla VII.2.2. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Lact. 192

Tabla VII.2.3. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Dnn. 197

Tabla VII.2.4. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Ger. 199

Tabla VII.2.5. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Nel. 204

Tabla VII.3.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Av. Kin. 208

Tabla VII.3.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Lac. 213

Tabla VII.3.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en Dnn. 218

Tabla VII.3.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en Ger. 221

Tabla VII.3.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Nel. 224

Tabla VII.4.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Av. Kin. 228

Tabla VII.4.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Lac. 233

Tabla VII.4.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en Dnn. 236

Tabla VII.4.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en Ger. 239

Tabla VII.4.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Nel. 243

Tabla VII.5.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Av. Kin. 247

Tabla VII.5.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Lac. 252

Tabla VII.5.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en Dnn. 257

Tabla VII.5.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en Ger. 260

Tabla VII.5.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Nel. 265

Tabla VII.6.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Av. Kin. 269

Tabla VII.6.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Lac. 273

Tabla VII.6.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con Dnn. 277

Tabla VII.6.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con Ger. 281

Tabla VII.6.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Nel. 285

VII. Anexos

VII.1. Estudios realizados con blancos de reactivos

Tabla VII.1.1. Datos obtenidos por el método alternativo durante la monitorización de blancos de reactivo.

Nº de muestra	Resultados (contaje/mL)	Nº de muestra	Resultados (contaje/mL)
1	0	45	49
2	10	46	0
3	20	47	0
4	20	48	10
5	413	49	20
6	0	50	39
7	20	51	0
8	49	52	59
9	49	53	79
10	29	54	10
11	0	55	0
12	49	56	10
13	0	57	79
14	0	58	108
15	0	59	0
16	59	60	0
17	10	61	10
18	0	62	59
19	10	63	20
20	0	64	0
21	0	65	10
22	20	66	51
23	10	67	0
24	20	68	20
25	0	69	20
26	0	70	0
27	10	71	0
28	112	72	10
29	0	73	10
30	0	74	30
31	275	75	0
32	0	76	0
33	0	77	10
34	0	78	10

Nº de muestra	Resultados (contaje/mL)	Nº de muestra	Resultados (contaje/mL)
35	78	79	0
36	41	80	0
37	10	81	0
38	69	82	0
39	0	83	0
40	49	84	10
41	0	85	0
42	0	86	0
43	29	87	10
44	10		

VII.2. Estudios realizados con blancos de muestra

Tabla VII.2.1. Datos obtenidos por el método alternativo durante la monitorización del caldo de cultivo y Av. Kin.

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
1	49	33	0
2	79	34	20
3	88	35	0
4	49	36	0
5	91	37	0
6	39	38	20
7	0	39	0
8	10	40	0
9	0	41	0
10	0	42	0
11	10	43	20
12	69	44	10
13	0	45	10
14	0	46	10
15	41	47	0
16	29	48	0
17	30	49	0
18	29	50	59
19	0	51	0
20	10	52	0
21	0	53	0
22	0	54	10
23	0	55	0
24	0	56	10
25	10	57	41
26	0	58	41
27	0	59	0
28	0	60	51
29	0	61	0
30	0	62	0
31	0	63	29
32	0	64	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
65	0	111	79
66	79	112	69
67	0	113	81
68	0	114	69
69	98	115	20
70	0	116	10
71	0	117	30
72	0	118	20
73	0	119	0
74	0	120	10
75	10	121	10
76	0	122	0
77	0	123	10
78	10	124	39
79	0	125	20
80	0	126	10
81	0	127	39
82	10	128	10
83	30	129	59
84	20	130	20
85	0	131	20
86	30	132	88
87	10	133	39
88	0	134	20
89	10	135	10
90	10	136	29
91	30	137	0
92	0	138	0
93	10	139	0
94	0	140	10
95	49	141	0
96	10	142	0
97	10	143	0
98	20	144	0
99	10	145	0
100	0	146	0
101	10	147	39
102	51	148	29

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
103	39	149	49
104	10	150	10
105	10	151	10
106	20	152	41
107	20	153	0
108	20	154	0
109	20	155	20
110	59	156	0
157	10	194	0
158	10	195	0
159	10	196	10
160	0	197	29
161	0	198	39
162	20	199	30
163	0	200	59
164	10	201	10
165	0	202	79
166	0	203	79
167	0	204	81
168	20	205	30
169	0	206	20
170	10	207	49
171	29	208	69
172	0	209	88
173	10	210	10
174	0	211	0
175	10	212	71
176	0	213	0
177	0	214	0
178	0	215	10
179	0	216	10
180	0	217	0
181	0	218	0
182	0	219	10
183	10	220	0
184	0	221	0
185	10	222	0
186	20	223	20

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
187	10	224	39
188	0	225	0
189	0	226	30
190	0	227	0
191	0	228	0
192	41	229	20
193	0	230	0
		231	0

Intervalo de resultados de 100-200 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
232	157	242	147
233	112	243	167
234	162	244	157
235	137	245	128
236	118	246	147
237	137	247	118
238	138	248	152
239	167	249	183
240	101	250	152
241	128	251	172
		252	183

Intervalo de resultados de 200-300 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
253	206	255	264
254	295	256	294
		257	265

Intervalo de resultados de 300-400 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
258	325	260	392
259	344	261	384

Tabla VII.2.2. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Lact.

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
1	0	127	0
2	0	128	0
3	0	129	10
4	20	130	0
5	0	131	0
6	10	132	10
7	20	133	0
8	0	134	20
9	0	135	20
10	41	136	0
11	10	137	0
12	0	138	41
13	10	139	20
14	10	140	0
15	0	141	0
16	0	142	10
17	0	143	20
18	20	144	0
19	10	145	71
20	49	146	10
21	0	147	10
22	0	148	51
23	0	149	0
24	0	150	0
25	10	151	41
26	0	152	0
27	29	153	0
28	0	154	10
29	41	155	0
30	0	156	0
31	0	157	10
32	0	158	20
33	0	159	41
34	0	160	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
35	0	161	10
36	0	162	98
37	81	163	10
38	0	164	10
39	10	165	0
40	10	166	10
41	0	167	10
42	0	168	41
43	0	169	0
44	0	170	10
45	10	171	0
46	20	172	10
47	0	173	10
48	10	174	10
49	0	175	20
50	0	176	0
51	0	177	20
52	0	178	10
53	0	179	0
54	0	180	0
55	0	181	0
56	88	182	51
57	41	183	0
58	0	184	0
59	10	185	0
60	0	186	20
61	10	187	0
62	49	188	0
63	0	189	71
64	79	190	10
65	0	191	0
66	10	192	20
67	10	193	61
68	0	194	10
69	10	195	0
70	0	196	91
71	20	197	20
72	0	198	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
73	20	199	0
74	0	200	10
75	10	201	10
76	0	202	41
77	0	203	0
78	0	204	10
79	20	205	20
80	0	206	71
81	10	207	0
82	10	208	0
83	0	209	0
84	10	210	10
85	20	211	10
86	30	212	30
87	0	213	10
88	0	214	30
89	71	215	20
90	10	216	10
91	41	217	0
92	41	218	20
93	71	219	30
94	0	220	10
95	0	221	10
96	30	222	20
97	20	223	10
98	51	224	0
99	30	225	0
100	20	226	0
101	51	227	10
102	30	228	51
103	10	229	0
104	29	230	10
105	10	231	10
106	0	232	61
107	0	233	0
108	20	234	51
109	0	235	0
110	20	236	10

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
111	20	237	10
112	10	238	0
113	30	239	10
114	20	240	0
115	30	241	0
116	61	242	10
117	10	243	0
118	30	244	0
119	20	245	0
120	10	246	0
121	0	247	10
122	0	248	20
123	0	249	0
124	10	250	0
125	10	251	20
126	0	252	10
		253	0

Intervalo de resultados de 100-200 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
254	137	261	183
255	183	262	173
256	142	263	111
257	112	264	101
258	132	265	121
259	108	266	142
260	101	267	101
		268	152

Intervalo de resultados de 200-300 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
269	234	272	236
270	264	273	254
271	223	274	233

Intervalo de resultados de 300-400 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
275	386	277	395
276	393	278	315

Tabla VII.2.3. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Dnn.

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
1	10	47	10
2	10	48	0
3	10	49	0
4	10	50	10
5	0	51	0
6	0	52	0
7	0	53	0
8	0	54	0
9	0	55	0
10	0	56	0
11	0	57	0
12	0	58	0
13	0	59	0
14	0	60	0
15	10	61	0
16	20	62	20
17	0	63	0
18	0	64	0
19	0	65	0
20	0	66	10
21	0	67	0
22	0	68	0
23	0	69	0
24	0	70	20
25	0	71	10
26	0	72	0
27	0	73	0
28	30	74	0
29	0	75	0
30	0	76	0
31	0	77	10
32	10	78	20
33	0	79	10
34	0	80	20

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
35	0	81	0
36	0	82	0
37	0	83	0
38	0	84	0
39	0	85	0
40	10	86	0
41	0	87	0
42	10	88	20
43	0	89	0
44	0	90	0
45	0	91	0
46	20	92	0

Intervalo de resultados de 100-200 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
93	152	94	142

Intervalo de resultados de 300-400 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
95	325		

Tabla VII.2.4. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Ger.

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
1	0	152	10
2	0	153	0
3	0	154	20
4	0	155	20
5	0	156	20
6	0	157	29
7	0	158	39
8	0	159	0
9	0	160	20
10	0	161	10
11	0	162	10
12	10	163	20
13	0	164	10
14	0	165	10
15	0	166	10
16	10	167	0
17	10	168	20
18	10	169	41
19	91	170	30
20	10	171	10
21	0	172	10
22	0	173	20
23	0	174	20
24	10	175	61
25	0	176	20
26	0	177	10
27	0	178	49
28	0	179	30
29	29	180	0
30	0	181	20
31	20	182	0
32	0	183	0
33	10	184	0
34	0	185	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
35	30	186	0
36	10	187	10
37	0	188	0
38	10	189	40
39	10	190	0
40	41	191	10
41	0	192	10
42	20	193	0
43	0	194	10
44	0	195	10
45	0	196	0
46	0	197	10
47	0	198	0
48	0	199	0
49	0	200	10
50	0	201	10
51	20	202	0
52	0	203	0
53	0	204	10
54	20	205	0
55	51	206	0
56	20	207	0
57	0	208	10
58	0	209	0
59	0	210	10
60	0	211	20
61	0	212	10
62	10	213	20
63	0	214	10
64	0	215	20
65	10	216	0
66	0	217	0
67	10	218	10
68	0	219	0
69	0	220	0
70	0	221	0
71	10	222	0
72	10	223	10

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
73	0	224	20
74	0	225	20
75	0	226	0
76	0	227	0
77	0	228	0
78	10	229	10
79	0	230	0
80	20	231	0
81	0	232	0
82	10	233	0
83	0	234	0
84	0	235	10
85	20	236	20
86	0	237	0
87	0	238	30
88	0	239	20
89	0	240	10
90	0	241	10
91	0	242	0
92	30	243	0
93	29	244	0
94	0	245	0
95	0	246	0
96	10	247	10
97	61	248	0
98	0	249	0
99	0	250	0
100	10	251	0
101	0	252	10
102	0	253	0
103	0	254	0
104	0	255	0
105	10	256	0
106	0	257	0
107	10	258	10
108	0	259	0
109	0	260	10
110	0	261	10

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
111	0	262	0
112	0	263	10
113	0	264	0
114	0	265	0
115	0	266	0
116	0	267	0
117	10	268	0
118	10	269	0
119	0	270	30
120	0	271	10
121	20	272	0
122	0	273	0
123	0	274	0
124	0	275	0
125	20	276	0
126	0	277	0
127	10	278	0
128	0	279	0
129	0	280	0
130	0	281	0
131	0	282	0
132	20	283	0
133	10	284	0
134	0	285	0
135	0	286	0
136	0	287	41
137	20	288	0
138	20	289	0
139	0	290	0
140	10	291	10
141	10	292	0
142	10	293	0
143	0	294	0
144	10	295	0
145	0	296	0
146	10	297	0
147	0	298	0
148	30	299	10

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
149	10	300	10
150	0	301	0
151	10	302	0
		303	0

Intervalo de resultados de 100-200 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
304	128	305	112
		306	142

Tabla VII.2.5. Datos del citómetro de flujo con muestras que contienen el caldo de cultivo y Nel.

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
1	20	83	0
2	20	84	0
3	20	85	0
4	61	86	0
5	81	87	10
6	71	88	0
7	30	89	0
8	10	90	0
9	41	91	0
10	30	92	10
11	0	93	10
12	10	94	0
13	0	95	0
14	0	96	10
15	0	97	0
16	20	98	0
17	41	99	10
18	10	100	0
19	10	101	10
20	0	102	0
21	0	103	0
22	10	104	0
23	0	105	0
24	0	106	0
25	0	107	0
26	0	108	0
27	10	109	0
28	0	110	0
29	10	111	0
30	0	112	0
31	0	113	10
32	0	114	0
33	10	115	0
34	10	116	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
35	10	117	10
36	0	118	0
37	0	119	10
38	0	120	0
39	0	121	20
40	10	122	0
41	20	123	0
42	20	124	10
43	0	125	0
44	0	126	0
45	10	127	0
46	10	128	0
47	0	129	0
48	10	130	10
49	0	131	0
50	10	132	81
51	10	133	0
52	10	134	0
53	10	135	0
54	10	136	0
55	10	137	0
56	0	138	0
57	20	139	0
58	0	140	0
59	10	141	0
60	10	142	0
61	10	143	0
62	20	144	0
63	10	145	0
64	30	146	0
65	10	147	0
66	0	148	0
67	10	149	20
68	10	150	10
69	0	151	20
70	0	152	39
71	10	153	0
72	10	154	0

Intervalo de resultados de 0-100 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
73	0	155	0
74	10	156	20
75	0	157	0
76	0	158	0
77	20	159	0
78	10	160	0
79	0	161	0
80	0	162	0
81	0	163	0
82	10	164	10

Intervalo de resultados de 100-200 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
165	193	165	193
		166	132

Intervalo de resultados de 200-300 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
167	203		

Intervalo de resultados de 300-400 contajes/mL			
Nº de muestra	**Resultados (contajes/mL)**	**Nº de muestra**	**Resultados (contajes/mL)**
168	396	169	304
		170	314

VII.3. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de geles

Leyenda:

- [a, b] **Nomenclatura para la numeración y denominación de muestras:** Las muestras son numeradas arábigamente con arreglo a la posición para el análisis **(columna número)** [a]. La denominación de las muestras se corresponde con la concentración teórica inoculada de microorganismo / número de frasco / número de vial **(columna muestra)** [b] **(Ejemplo:** 0.265 B1 1 se corresponde con una concentración teórica inoculada de 0.265 microorganismos, del frasco número 1 y medida en el vial 1).
- [c] **Método tradicional selectivo (MTS):** resultados correspondientes a la siembra de *Pseudomonas aeruginosa* en medio selectivo cetrimide y expresados en u.f.c./placa.
- [d] **Método tradicional general (MTG):** resultados correspondientes a la siembra de *Pseudomonas aeruginosa* en medio general TSA y expresados en u.f.c./placa.
- [e] **Contaje/mL**: número de microorganismos contados por el citómetro de flujo.
- [f] **Observaciones:** las muestras clasificadas positivas por el citómetro de flujo se indican en **negrita.**

Tabla VII.3.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Av. Kin.

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
1	0.265 B1 1	0	0	0	
2	0.265 B1 2	0	0	0	Inoculación no
3	0.265 B1 3	0	0	10	efectiva de *P.*
4	0.265 B1 4	0	0	0	*aeruginosa*
5	0.265 B1 5	0	0	0	
6	0.265 B2 1	0	>300	473	Inoculación no
7	0.265 B2 2	0	>300	275	efectiva de *P.*
8	0.265 B2 3	0	>300	629	*aeruginosa*
9	0.265 B2 4	0	>300	648	Presencia otros
10	0.265 B2 5	0	>300	324	microorganismos
11	0.265 B3 1	0	0	0	
12	0.265 B3 2	0	0	0	Inoculación no
13	0.265 B3 3	0	0	0	efectiva de *P.*
14	0.265 B3 4	0	0	0	*aeruginosa*
15	0.265 B3 5	0	0	39	
16	0.265 B4 1	0	0	29	
17	0.265 B4 2	0	0	49	Inoculación no
18	0.265 B4 3	0	0	10	efectiva de *P.*
19	0.265 B4 4	0	0	10	*aeruginosa*
20	0.265 B4 5	0	0	41	
21	0.265 B5 1	0	0	0	
22	0.265 B5 2	0	0	0	Inoculación no
23	0.265 B5 3	0	0	20	efectiva de *P.*
24	0.265 B5 4	0	0	0	*aeruginosa*
25	0.265 B5 5	0	0	10	
26	0.265 B6 1	0	0	10	
27	0.265 B6 2	0	0	10	Inoculación no
28	0.265 B6 3	0	0	0	efectiva de *P.*
29	0.265 B6 4	0	0	0	*aeruginosa*
30	0.265 B6 5	0	0	20	
31	**0.265 B7 1**	**>300**	**>300**	**985014**	
32	**0.265 B7 2**	**>300**	**>300**	**986025**	**Inoculación**
33	**0.265 B7 3**	**>300**	**>300**	**1064113**	**efectiva de *P.***
34	**0.265 B7 4**	**>300**	**>300**	**1081171**	***aeruginosa***
35	**0.265 B7 5**	**>300**	**>300**	**1027710**	
36	0.265 B8 1	0	0	0	
37	0.265 B8 2	0	0	10	Inoculación no

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
38	0.265 B8 3	0	0	0	efectiva de *P. aeruginosa*
39	0.265 B8 4	0	0	0	
40	0.265 B8 5	0	0	0	
41	**0.53 B1 1**	**>300**	**>300**	**2254074**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
42	**0.53 B1 2**	**>300**	**>300**	**2256209**	
43	**0.53 B1 3**	**>300**	**>300**	**2182276**	
44	**0.53 B1 4**	**>300**	**>300**	**2248404**	
45	**0.53 B1 5**	**>300**	**>300**	**2229323**	
46	**0.53 B2 1**	**>300**	**>300**	**1320825**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
47	**0.53 B2 2**	**>300**	**>300**	**1403431**	
48	**0.53 B2 3**	**>300**	**>300**	**1475417**	
49	**0.53 B2 4**	**>300**	**>300**	**1477083**	
50	**0.53 B2 5**	**>300**	**>300**	**1460038**	
51	0.53 B3 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
52	0.53 B3 2	0	0	0	
53	0.53 B3 3	0	0	10	
54	0.53 B3 4	0	0	29	
55	0.53 B3 5	0	0	0	
56	0.53 B4 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
57	0.53 B4 2	0	0	0	
58	0.53 B4 3	0	0	10	
59	0.53 B4 4	0	0	0	
60	0.53 B4 5	0	0	0	
61	**0.53 B5 1**	**>300**	**>300**	**851092**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
62	**0.53 B5 2**	**>300**	**>300**	**896054**	
63	**0.53 B5 3**	**>300**	**>300**	**668019**	
64	**0.53 B5 4**	**>300**	**>300**	**716366**	
65	**0.53 B5 5**	**>300**	**>300**	**745038**	
66	0.53 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
67	0.53 B6 2	0	0	0	
68	0.53 B6 3	0	0	0	
69	0.53 B6 4	0	0	0	
70	0.53 B6 5	0	0	0	
71	**0.53 B7 1**	**>300**	**>300**	**1640912**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
72	**0.53 B7 2**	**>300**	**>300**	**1712624**	
73	**0.53 B7 3**	**>300**	**>300**	**1708519**	
74	**0.53 B7 4**	**>300**	**>300**	**1687209**	
75	**0.53 B7 5**	**>300**	**>300**	**1788899**	
76	**0.53 B8 1**	**>300**	**>300**	**1108374**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
77	**0.53 B8 2**	**>300**	**>300**	**1203368**	
78	**0.53 B8 3**	**>300**	**>300**	**1174199**	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
79	**0.53 B8 4**	**>300**	**>300**	**1188114**	
80	**0.53 B8 5**	**>300**	**>300**	**1258949**	
81	1.0625 B1 1	0	0	295	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
82	1.0625 B1 2	0	0	101	
83	1.0625 B1 3	0	0	10	
84	1.0625 B1 4	0	0	0	
85	1.0625 B1 5	0	0	10	
86	**1.0625 B2 1**	**>300**	**>300**	**931712**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
87	**1.0625 B2 2**	**>300**	**>300**	**943464**	
88	**1.0625 B2 3**	**>300**	**>300**	**955525**	
89	**1.0625 B2 4**	**>300**	**>300**	**951053**	
90	**1.0625 B2 5**	**>300**	**>300**	**951506**	
91	1.0625 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
92	1.0625 B3 2	0	0	20	
93	1.0625 B3 3	0	0	264	
94	1.0625 B3 4	0	0	0	
95	1.0625 B3 5	0	0	0	
96	1.0625 B4 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
97	1.0625 B4 2	0	0	0	
98	1.0625 B4 3	0	0	0	
99	1.0625 B4 4	0	0	0	
100	1.0625 B4 5	0	0	0	
101	**1.0625 B5 1**	**>300**	**>300**	**1820836**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
102	**1.0625 B5 2**	**>300**	**>300**	**1845443**	
103	**1.0625 B5 3**	**>300**	**>300**	**1877430**	
104	**1.0625 B5 4**	**>300**	**>300**	**1868910**	
105	**1.0625 B5 5**	**>300**	**>300**	**1925369**	
106	**1.0625 B6 1**	**>300**	**>300**	**1974143**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
107	**1.0625 B6 2**	**>300**	**>300**	**2216584**	
108	**1.0625 B6 3**	**>300**	**>300**	**2090266**	
109	**1.0625 B6 4**	**>300**	**>300**	**2179180**	
110	**1.0625 B6 5**	**>300**	**>300**	**2141912**	
111	**1.0625 B7 1**	**>300**	**>300**	**1273015**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
112	**1.0625 B7 2**	**>300**	**>300**	**1403256**	
113	**1.0625 B7 3**	**>300**	**>300**	**1351095**	
114	**1.0625 B7 4**	**>300**	**>300**	**1430944**	
115	**1.0625 B7 5**	**>300**	**>300**	**1480803**	
116	1.0625 B8 1	0	0	41	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
117	1.0625 B8 2	0	0	0	
118	1.0625 B8 3	0	0	0	
119	1.0625 B8 4	0	0	0	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
120	1.0625 B8 5	0	0	10	
121	**2.125 B1 1**	**>300**	**>300**	**2676000**	
122	**2.125 B1 2**	**>300**	**>300**	**2759933**	**Inoculación**
123	**2.125 B1 3**	**>300**	**>300**	**2795707**	**efectiva de *P.***
124	**2.125 B1 4**	**>300**	**>300**	**2821041**	***aeruginosa***
125	**2.125 B1 5**	**>300**	**>300**	**2520316**	
126	**2.125 B2 1**	**>300**	**>300**	**1197412**	
127	**2.125 B2 2**	**>300**	**>300**	**1215386**	**Inoculación**
128	**2.125 B2 3**	**>300**	**>300**	**1267884**	**efectiva de *P.***
129	**2.125 B2 4**	**>300**	**>300**	**1289654**	***aeruginosa***
130	**2.125 B2 5**	**>300**	**>300**	**1307458**	
131	**2.125 B3 1**	**>300**	**>300**	**1847681**	
132	**2.125 B3 2**	**>300**	**>300**	**1893289**	**Inoculación**
133	**2.125 B3 3**	**>300**	**>300**	**2010252**	**efectiva de *P.***
134	**2.125 B3 4**	**>300**	**>300**	**2005604**	***aeruginosa***
135	**2.125 B3 5**	**>300**	**>300**	**1943628**	
136	**2.125 B4 1**	**>300**	**>300**	**1868418**	
137	**2.125 B4 2**	**>300**	**>300**	**1957087**	**Inoculación**
138	**2.125 B4 3**	**>300**	**>300**	**1909989**	**efectiva de *P.***
139	**2.125 B4 4**	**>300**	**>300**	**1990700**	***aeruginosa***
140	**2.125 B4 5**	**>300**	**>300**	**1999664**	
141	**2.125 B5 1**	**>300**	**>300**	**2442676**	
142	**2.125 B5 2**	**>300**	**>300**	**2601794**	**Inoculación**
143	**2.125 B5 3**	**>300**	**>300**	**2592148**	**efectiva de *P.***
144	**2.125 B5 4**	**>300**	**>300**	**2609774**	***aeruginosa***
145	**2.125 B5 5**	**>300**	**>300**	**2593573**	
146	**2.125 B6 1**	**>300**	**>300**	**2345708**	
147	**2.125 B6 2**	**>300**	**>300**	**2324672**	**Inoculación**
148	**2.125 B6 3**	**>300**	**>300**	**2480312**	**efectiva de *P.***
149	**2.125 B6 4**	**>300**	**>300**	**2372382**	***aeruginosa***
150	**2.125 B6 5**	**>300**	**>300**	**2399315**	
151	**2.125 B7 1**	**>300**	**>300**	**2395512**	
152	**2.125 B7 2**	**>300**	**>300**	**2395718**	**Inoculación**
153	**2.125 B7 3**	**>300**	**>300**	**2413134**	**efectiva de *P.***
154	**2.125 B7 4**	**>300**	**>300**	**2565273**	***aeruginosa***
155	**2.125 B7 5**	**>300**	**>300**	**2547581**	
156	**2.125 B8 1**	**>300**	**>300**	**2616286**	
157	**2.125 B8 2**	**>300**	**>300**	**2656000**	**Inoculación**
158	**2.125 B8 3**	**>300**	**>300**	**2437683**	**efectiva de *P.***
159	**2.125 B8 4**	**>300**	**>300**	**2655688**	***aeruginosa***
160	**2.125 B8 5**	**>300**	**>300**	**2651054**	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
161	4.25 B1 1	>300	>300	2854478	
162	4.25 B1 2	>300	>300	2886407	Inoculación
163	4.25 B1 3	>300	>300	2889427	efectiva de *P.*
164	4.25 B1 4	>300	>300	2912107	*aeruginosa*
165	4.25 B1 5	>300	>300	2895144	
166	4.25 B2 1	>300	>300	2629598	
167	4.25 B2 2	>300	>300	2692298	Inoculación
168	4.25 B2 3	>300	>300	2670405	efectiva de *P.*
169	4.25 B2 4	>300	>300	2636887	*aeruginosa*
170	4.25 B2 5	>300	>300	2697406	
171	4.25 B3 1	>300	>300	2883830	
172	4.25 B3 2	>300	>300	2973965	Inoculación
173	4.25 B3 3	>300	>300	2902797	efectiva de *P.*
174	4.25 B3 4	>300	>300	2977228	*aeruginosa*
175	4.25 B3 5	>300	>300	2914162	
176	4.25 B4 1	>300	>300	2860926	
177	4.25 B4 2	>300	>300	2823554	Inoculación
178	4.25 B4 3	>300	>300	2772648	efectiva de *P.*
179	4.25 B4 4	>300	>300	2890562	*aeruginosa*
180	4.25 B4 5	>300	>300	2839336	
181	4.25 B5 1	>300	>300	2548806	
182	4.25 B5 2	>300	>300	2555002	Inoculación
183	4.25 B5 3	>300	>300	2606451	efectiva de *P.*
184	4.25 B5 4	>300	>300	2561023	*aeruginosa*
185	4.25 B5 5	>300	>300	2631519	
186	4.25 B6 1	>300	>300	3057596	
187	4.25 B6 2	>300	>300	2986554	Inoculación
188	4.25 B6 3	>300	>300	2974351	efectiva de *P.*
189	4.25 B6 4	>300	>300	3041198	*aeruginosa*
190	4.25 B6 5	>300	>300	2946113	
191	4.25 B7 1	>300	>300	2852830	
192	4.25 B7 2	>300	>300	2951965	Inoculación
193	4.25 B7 3	>300	>300	2903197	efectiva de *P.*
194	4.25 B7 4	>300	>300	2966228	*aeruginosa*
195	4.25 B7 5	>300	>300	2977162	
196	4.25 B8 1	>300	>300	2873926	
197	4.25 B8 2	>300	>300	2896554	Inoculación
198	4.25 B8 3	>300	>300	2842648	efectiva de *P.*
199	4.25 B8 4	>300	>300	2790462	*aeruginosa*
200	4.25 B8 5	>300	>300	2827336	

Tabla VII.3.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Lac.

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
1	0.2226 B1 1	0	0	315	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
2	0.2226 B1 2	0	0	30	
3	0.2226 B1 3	0	0	10	
4	0.2226 B1 4	0	0	29	
5	0.2226 B1 5	0	0	10	
6	0.2226 B2 1	0	0	108	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
7	0.2226 B2 2	0	0	0	
8	0.2226 B2 3	0	0	0	
9	0.2226 B2 4	0	0	20	
10	0.2226 B2 5	0	0	0	
11	0.2226 B3 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
12	0.2226 B3 2	0	0	20	
13	0.2226 B3 3	0	0	10	
14	0.2226 B3 4	0	0	30	
15	0.2226 B3 5	0	0	20	
16	0.2226 B4 1	0	0	101	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
17	0.2226 B4 2	0	0	30	
18	0.2226 B4 3	0	0	61	
19	0.2226 B4 4	0	0	10	
20	0.2226 B4 5	0	0	30	
21	0.2226 B5 1	0	0	264	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
22	0.2226 B5 2	0	0	20	
23	0.2226 B5 3	0	0	10	
24	0.2226 B5 4	0	0	0	
25	0.2226 B5 5	0	0	0	
26	0.2226 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
27	0.2226 B6 2	0	0	10	
28	0.2226 B6 3	0	0	10	
29	0.2226 B6 4	0	0	0	
30	0.2226 B6 5	0	0	0	
31	0.2226 B7 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
32	0.2226 B7 2	0	0	10	
33	0.2226 B7 3	0	0	0	
34	0.2226 B7 4	0	0	0	
35	0.2226 B7 5	0	0	10	
36	0.2226 B8 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P.*
37	0.2226 B8 2	0	0	20	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
38	0.2226 B8 3	0	0	20	*aeruginosa*
39	0.2226 B8 4	0	0	0	
40	0.2226 B8 5	0	0	0	
41	0.4453 B1 1	0	>300	1701212	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa* Presencia otros microorganismos
42	0.4453 B1 2	0	>300	1733714	
43	0.4453 B1 3	0	>300	1798458	
44	0.4453 B1 4	0	>300	1756679	
45	0.4453 B1 5	0	>300	1904933	
46	0.4453 B2 1	0	0	223	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
47	0.4453 B2 2	0	0	41	
48	0.4453 B2 3	0	0	20	
49	0.4453 B2 4	0	0	0	
50	0.4453 B2 5	0	0	0	
51	0.4453 B3 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
52	0.4453 B3 2	0	0	20	
53	0.4453 B3 3	0	0	0	
54	0.4453 B3 4	0	0	71	
55	0.4453 B3 5	0	0	10	
56	0.4453 B4 1	0	0	183	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
57	0.4453 B4 2	0	0	10	
58	0.4453 B4 3	0	0	51	
59	0.4453 B4 4	0	0	0	
60	0.4453 B4 5	0	0	41	
61	0.4453 B5 1	0	0	236	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
62	0.4453 B5 2	0	0	0	
63	0.4453 B5 3	0	0	0	
64	0.4453 B5 4	0	0	10	
65	0.4453 B5 5	0	0	0	
66	0.4453 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
67	0.4453 B6 2	0	0	10	
68	0.4453 B6 3	0	0	20	
69	0.4453 B6 4	0	0	41	
70	0.4453 B6 5	0	0	0	
71	0.4453 B7 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
72	0.4453 B7 2	0	0	98	
73	0.4453 B7 3	0	0	10	
74	0.4453 B7 4	0	0	10	
75	0.4453 B7 5	0	0	0	
76	0.4453 B8 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
77	0.4453 B8 2	0	0	10	
78	0.4453 B8 3	0	0	41	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
79	0.4453 B8 4	0	0	0	
80	0.4453 B8 5	0	0	10	
81	0.89 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
82	0.89 B1 2	0	0	10	
83	0.89 B1 3	0	0	10	
84	0.89 B1 4	0	0	10	
85	0.89 B1 5	0	0	20	
86	0.89 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
87	0.89 B2 2	0	0	20	
88	0.89 B2 3	0	0	10	
89	0.89 B2 4	0	0	0	
90	0.89 B2 5	0	0	0	
91	0.89 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
92	0.89 B3 2	0	0	61	
93	0.89 B3 3	0	0	0	
94	0.89 B3 4	0	0	0	
95	0.89 B3 5	0	0	0	
96	0.89 B4 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
97	0.89 B4 2	0	0	0	
98	0.89 B4 3	0	0	0	
99	0.89 B4 4	0	0	71	
100	0.89 B4 5	0	0	10	
101	**0.89 B5 1**	**>300**	**>300**	**2130634**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
102	**0.89 B5 2**	**>300**	**>300**	**2315056**	
103	**0.89 B5 3**	**>300**	**>300**	**2187369**	
104	**0.89 B5 4**	**>300**	**>300**	**2224045**	
105	**0.89 B5 5**	**>300**	**>300**	**2257132**	
106	0.89 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
107	0.89 B6 2	0	0	20	
108	0.89 B6 3	0	0	10	
109	0.89 B6 4	0	0	61	
110	0.89 B6 5	0	0	0	
111	0.89 B7 1	0	0	91	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
112	0.89 B7 2	0	0	20	
113	0.89 B7 3	0	0	0	
114	0.89 B7 4	0	0	0	
115	0.89 B7 5	0	0	10	
116	0.89 B8 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
117	0.89 B8 2	0	0	41	
118	0.89 B8 3	0	0	0	
119	0.89 B8 4	0	0	173	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
120	0.89 B8 5	0	0	10	
121	1.7812 B1 1	0	0	20	
122	1.7812 B1 2	0	0	71	Inoculación no
123	1.7812 B1 3	0	0	0	efectiva de *P.*
124	1.7812 B1 4	0	0	0	*aeruginosa*
125	1.7812 B1 5	0	0	20	
126	1.7812 B2 1	0	0	0	
127	1.7812 B2 2	0	0	10	Inoculación no
128	1.7812 B2 3	0	0	10	efectiva de *P.*
129	1.7812 B2 4	0	0	30	*aeruginosa*
130	1.7812 B2 5	0	0	10	
131	**1.7812 B3 1**	**>300**	**>300**	**2666294**	
132	**1.7812 B3 2**	**>300**	**>300**	**2789054**	**Inoculación**
133	**1.7812 B3 3**	**>300**	**>300**	**2736634**	**efectiva de *P.***
134	**1.7812 B3 4**	**>300**	**>300**	**2749904**	***aeruginosa***
135	**1.7812 B3 5**	**>300**	**>300**	**2797737**	
136	1.7812 B4 1	0	0	30	
137	1.7812 B4 2	0	0	20	Inoculación no
138	1.7812 B4 3	0	0	10	efectiva de *P.*
139	1.7812 B4 4	0	0	0	*aeruginosa*
140	1.7812 B4 5	0	0	20	
141	1.7812 B5 1	0	0	30	
142	1.7812 B5 2	0	0	10	Inoculación no
143	1.7812 B5 3	0	0	10	efectiva de *P.*
144	1.7812 B5 4	0	0	254	*aeruginosa*
145	1.7812 B5 5	0	0	20	
146	1.7812 B6 1	0	0	10	
147	1.7812 B6 2	0	0	0	Inoculación no
148	1.7812 B6 3	0	0	0	efectiva de *P.*
149	1.7812 B6 4	0	0	0	*aeruginosa*
150	1.7812 B6 5	0	0	233	
151	**1.7812 B7 1**	**>300**	**>300**	**2676051**	
152	**1.7812 B7 2**	**>300**	**>300**	**2648023**	**Inoculación**
153	**1.7812 B7 3**	**>300**	**>300**	**2635180**	**efectiva de *P.***
154	**1.7812 B7 4**	**>300**	**>300**	**2710802**	***aeruginosa***
155	**1.7812 B7 5**	**>300**	**>300**	**2628206**	
156	**1.7812 B8 1**	**>300**	**>300**	**2658427**	
157	**1.7812 B8 2**	**>300**	**>300**	**2663873**	**Inoculación**
158	**1.7812 B8 3**	**>300**	**>300**	**2614978**	**efectiva de *P.***
159	**1.7812 B8 4**	**>300**	**>300**	**2753212**	***aeruginosa***
160	**1.7812 B8 5**	**>300**	**>300**	**2735258**	

Número [a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
161	3.5625 B1 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
162	3.5625 B1 2	0	0	51	
163	3.5625 B1 3	0	0	0	
164	3.5625 B1 4	0	0	10	
165	3.5625 B1 5	0	0	10	
166	**3.5625 B2 1**	**>300**	**>300**	**2966593**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
167	**3.5625 B2 2**	**>300**	**>300**	**3006993**	
168	**3.5625 B2 3**	**>300**	**>300**	**3032924**	
169	**3.5625 B2 4**	**>300**	**>300**	**3050749**	
170	**3.5625 B2 5**	**>300**	**>300**	**3016063**	
171	**3.5625 B3 1**	**>300**	**>300**	**3063761**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
172	**3.5625 B3 2**	**>300**	**>300**	**3043610**	
173	**3.5625 B3 3**	**>300**	**>300**	**3109490**	
174	**3.5625 B3 4**	**>300**	**>300**	**3117480**	
175	**3.5625 B3 5**	**>300**	**>300**	**3082466**	
176	3.5625 B4 1	0	0	61	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
177	3.5625 B4 2	0	0	0	
178	3.5625 B4 3	0	0	111	
179	3.5625 B4 4	0	0	101	
180	3.5625 B4 5	0	0	51	
181	**3.5625 B5 1**	**>300**	**>300**	**3012684**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
182	**3.5625 B5 2**	**>300**	**>300**	**3110107**	
183	**3.5625 B5 3**	**>300**	**>300**	**3024083**	
184	**3.5625 B5 4**	**>300**	**>300**	**3027894**	
185	**3.5625 B5 5**	**>300**	**>300**	**3052060**	
186	**3.5625 B6 1**	**>300**	**>300**	**3123349**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
187	**3.5625 B6 2**	**>300**	**>300**	**3210702**	
188	**3.5625 B6 3**	**>300**	**>300**	**3156065**	
189	**3.5625 B6 4**	**>300**	**>300**	**3100750**	
190	**3.5625 B6 5**	**>300**	**>300**	**3131157**	
191	**3.5625 B7 1**	**>300**	**>300**	**3067058**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
192	**3.5625 B7 2**	**>300**	**>300**	**3115468**	
193	**3.5625 B7 3**	**>300**	**>300**	**3096382**	
194	**3.5625 B7 4**	**>300**	**>300**	**3178433**	
195	**3.5625 B7 5**	**>300**	**>300**	**3157081**	
196	**3.5625 B8 1**	**>300**	**>300**	**77631**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
197	**3.5625 B8 2**	**>300**	**>300**	**89932**	
198	**3.5625 B8 3**	**>300**	**>300**	**1079252**	
199	**3.5625 B8 4**	**>300**	**>300**	**1126560**	
200	**3.5625 B8 5**	**>300**	**>300**	**1276754**	

Tabla VII.3.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en Dnn.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
1	0.28125 B1 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
2	0.28125 B1 2	0	0	10	
3	0.28125 B1 3	0	0	10	
4	**0.28125 B2 1**	**>300**	**>300**	**701822**	**Inoculación efectiva de *P. aeruginosa***
5	**0.28125 B2 2**	**>300**	**>300**	**732110**	
6	**0.28125 B2 3**	**>300**	**>300**	**779659**	
7	0.28125 B3 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
8	0.28125 B3 2	0	0	0	
9	0.28125 B3 3	0	0	0	
10	0.28125 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
11	0.28125 B4 2	0	0	0	
12	0.28125 B4 3	0	0	0	
13	0.28125 B5 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
14	0.28125 B5 2	0	0	0	
15	0.28125 B5 3	0	0	0	
16	0.28125 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
17	0.28125 B6 2	0	0	0	
18	0.28125 B6 3	0	0	10	
19	0.28125 B7 1	0	>300	283	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*. Otros
20	0.28125 B7 2	0	>300	212	
21	0.28125 B7 3	0	>300	232	
22	0.28125 B8 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
23	0.28125 B8 2	0	0	0	
24	0.28125 B8 3	0	0	0	
25	0.5625 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
26	0.5625 B1 2	0	0	0	
27	0.5625 B1 3	0	0	0	
28	0.5625 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
29	0.5625 B2 2	0	0	0	
30	0.5625 B2 3	0	0	0	
31	0.5625 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
32	0.5625 B3 2	0	0	0	
33	0.5625 B3 3	0	0	0	
34	0.5625 B4 1	0	0	30	Inoculación no efectiva de *P. aeruginosa*
35	0.5625 B4 2	0	0	0	
36	0.5625 B4 3	0	0	0	
37	**0.5625 B5 1**	**>300**	**>300**	**2257312**	**Inoculación efectiva de *P.***
38	**0.5625 B5 2**	**>300**	**>300**	**2308846**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
39	**0.5625 B5 3**	**>300**	**>300**	**2459506**	***aeruginosa***
40	0.5625 B6 1	0	0	0	Inoculación no
41	0.5625 B6 2	0	0	10	efectiva de *P.*
42	0.5625 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
43	**0.5625 B7 1**	**>300**	**>300**	**1050654**	**Inoculación**
44	**0.5625 B7 2**	**>300**	**>300**	**942955**	**efectiva de *P.***
45	**0.5625 B7 3**	**>300**	**>300**	**924379**	***aeruginosa***
46	0.5625 B8 1	0	0	0	Inoculación no
47	0.5625 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
48	0.5625 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
49	**1.125 B1 1**	**>300**	**>300**	**2872875**	**Inoculación**
50	**1.125 B1 2**	**>300**	**>300**	**2853902**	**efectiva de *P.***
51	**1.125 B1 3**	**>300**	**>300**	**2872811**	***aeruginosa***
52	1.125 B2 1	0	0	0	Inoculación no
53	1.125 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
54	1.125 B2 3	0	0	0	*aeruginosa*
55	**1.125 B3 1**	**>300**	**>300**	**2661240**	**Inoculación**
56	**1.125 B3 2**	**>300**	**>300**	**2734920**	**efectiva de *P.***
57	**1.125 B3 3**	**>300**	**>300**	**2663027**	***aeruginosa***
58	**1.125 B4 1**	**>300**	**>300**	**1973638**	**Inoculación**
59	**1.125 B4 2**	**>300**	**>300**	**1917777**	**efectiva de *P.***
60	**1.125 B4 3**	**>300**	**>300**	**2066797**	***aeruginosa***
61	**1.125 B5 1**	**>300**	**>300**	**4546155**	**Inoculación**
62	**1.125 B5 2**	**>300**	**>300**	**4657819**	**efectiva de *P.***
63	**1.125 B5 3**	**>300**	**>300**	**1923748**	***aeruginosa***
64	**1.125 B6 1**	**>300**	**>300**	**2390514**	**Inoculación**
65	**1.125 B6 2**	**>300**	**>300**	**2389190**	**efectiva de *P.***
66	**1.125 B6 3**	**>300**	**>300**	**2348147**	***aeruginosa***
67	1.125 B7 1	0	0	10	Inoculación no
68	1.125 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
69	1.125 B7 3	0	0	10	*aeruginosa*
70	1.125 B8 1	0	0	0	Inoculación no
71	1.125 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
72	1.125 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
73	**2.25 B1 1**	**>300**	**>300**	**2133493**	**Inoculación**
74	**2.25 B1 2**	**>300**	**>300**	**2219117**	**efectiva de *P.***
75	**2.25 B1 3**	**>300**	**>300**	**2290052**	***aeruginosa***
76	**2.25 B2 1**	**>300**	**>300**	**2671257**	**Inoculación**
77	**2.25 B2 2**	**>300**	**>300**	**2506919**	**efectiva de *P.***
78	**2.25 B2 3**	**>300**	**>300**	**2665898**	***aeruginosa***
79	**2.25 B3 1**	**>300**	**>300**	**2418249**	**Inoculación**

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
80	2.25 B3 2	>300	>300	2473659	efectiva de *P.*
81	2.25 B3 3	>300	>300	2592192	*aeruginosa*
82	2.25 B4 1	>300	>300	2509610	Inoculación
83	2.25 B4 2	>300	>300	2426815	efectiva de *P.*
84	2.25 B4 3	>300	>300	2586692	*aeruginosa*
85	2.25 B5 1	>300	>300	2403908	Inoculación
86	2.25 B5 2	>300	>300	2527027	efectiva de *P.*
87	2.25 B5 3	>300	>300	2435774	*aeruginosa*
88	2.25 B6 1	>300	>300	2684094	Inoculación
89	2.25 B6 2	>300	>300	2692420	efectiva de *P.*
90	2.25 B6 3	>300	>300	2726591	*aeruginosa*
91	2.25 B7 1	>300	>300	2758063	Inoculación
92	2.25 B7 2	>300	>300	2881996	efectiva de *P.*
93	2.25 B7 3	>300	>300	2775807	*aeruginosa*
94	2.25 B8 1	>300	>300	2811394	Inoculación
95	2.25 B8 2	>300	>300	2857574	efectiva de *P.*
96	2.25 B8 3	>300	>300	2844339	*aeruginosa*
97	4.5 B1 1	>300	>300	2825805	Inoculación
98	4.5 B1 2	>300	>300	2719305	efectiva de *P.*
99	4.5 B1 3	>300	>300	2838479	*aeruginosa*
100	4.5 B2 1	>300	>300	2816812	Inoculación
101	4.5 B2 2	>300	>300	2858217	efectiva de *P.*
102	4.5 B2 3	>300	>300	2917607	*aeruginosa*
103	4.5 B3 1	>300	>300	208059	Inoculación
104	4.5 B3 2	>300	>300	188430	efectiva de *P.*
105	4.5 B3 3	>300	>300	210249	*aeruginosa*
106	4.5 B4 1	>300	>300	3843887	Inoculación
107	4.5 B4 2	>300	>300	3916667	efectiva de *P.*
108	4.5 B4 3	>300	>300	3837279	*aeruginosa*
109	4.5 B5 1	>300	>300	2879117	Inoculación
110	4.5 B5 2	>300	>300	2901374	efectiva de *P.*
111	4.5 B5 3	>300	>300	2944112	*aeruginosa*
112	4.5 B6 1	>300	>300	1276340	Inoculación
113	4.5 B6 2	>300	>300	1192137	efectiva de *P.*
114	4.5 B6 3	>300	>300	1230383	*aeruginosa*
115	4.5 B7 1	>300	>300	2595279	Inoculación
116	4.5 B7 2	>300	>300	2695496	efectiva de *P.*
117	4.5 B7 3	>300	>300	2688953	*aeruginosa*
118	4.5 B8 1	>300	>300	3000043	Inoculación
119	4.5 B8 2	>300	>300	3000795	efectiva de *P.*
120	4.5 B8 3	>300	>300	3081782	*aeruginosa*

Tabla VII.3.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en Ger.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG[d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
1	0.28125 B1 1	0	0	10	Inoculación no
2	0.28125 B1 2	0	0	10	efectiva de *P.*
3	0.28125 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
4	0.28125 B2 1	0	0	10	Inoculación no
5	0.28125 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
6	0.28125 B2 3	0	0	40	*aeruginosa*
7	0.28125 B3 1	0	0	0	Inoculación no
8	0.28125 B3 2	0	0	10	efectiva de *P.*
9	0.28125 B3 3	0	0	10	*aeruginosa*
10	0.28125 B4 1	0	0	0	Inoculación no
11	0.28125 B4 2	0	0	10	efectiva de *P.*
12	0.28125 B4 3	0	0	10	*aeruginosa*
13	0.28125 B5 1	0	0	0	Inoculación no
14	0.28125 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*
15	0.28125 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
16	0.28125 B6 1	0	0	0	Inoculación no
17	0.28125 B6 2	0	0	10	efectiva de *P.*
18	0.28125 B6 3	0	0	10	*aeruginosa*
19	0.28125 B7 1	0	0	0	Inoculación no
20	0.28125 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
21	0.28125 B7 3	0	0	10	*aeruginosa*
22	0.28125 B8 1	0	0	0	Inoculación no
23	0.28125 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
24	0.28125 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
25	0.5625 B1 1	0	0	10	Inoculación no
26	0.5625 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
27	0.5625 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
28	0.5625 B2 1	0	0	20	Inoculación no
29	0.5625 B2 2	0	0	10	efectiva de *P.*
30	0.5625 B2 3	0	0	20	*aeruginosa*
31	0.5625 B3 1	0	0	0	Inoculación no
32	0.5625 B3 2	0	0	0	efectiva de *P.*
33	0.5625 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
34	0.5625 B4 1	0	0	10	Inoculación no
35	0.5625 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
36	0.5625 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
37	0.5625 B5 1	0	0	0	Inoculación no
38	0.5625 B5 2	0	0	0	efectiva de *P.*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG[d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
39	0.5625 B5 3	0	0	10	*aeruginosa*
40	0.5625 B6 1	0	0	20	Inoculación no
41	0.5625 B6 2	0	0	20	efectiva de *P.*
42	0.5625 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
43	0.5625 B7 1	0	0	0	Inoculación no
44	0.5625 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
45	0.5625 B7 3	0	0	10	*aeruginosa*
46	0.5625 B8 1	0	0	0	Inoculación no
47	0.5625 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
48	0.5625 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
49	1.125 B1 1	0	0	0	Inoculación no
50	1.125 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
51	1.125 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
52	1.125 B2 1	0	0	20	Inoculación no
53	1.125 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
54	1.125 B2 3	0	0	30	*aeruginosa*
55	1.125 B3 1	0	0	20	Inoculación no
56	1.125 B3 2	0	0	10	efectiva de *P.*
57	1.125 B3 3	0	0	10	*aeruginosa*
58	1.125 B4 1	0	0	0	Inoculación no
59	1.125 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
60	1.125 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
61	1.125 B5 1	0	0	0	Inoculación no
62	1.125 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*
63	1.125 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
64	1.125 B6 1	0	0	0	Inoculación no
65	1.125 B6 2	0	0	0	efectiva de *P.*
66	1.125 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
67	1.125 B7 1	0	0	10	Inoculación no
68	1.125 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
69	1.125 B7 3	0	0	0	*aeruginosa*
70	1.125 B8 1	0	0	0	Inoculación no
71	1.125 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
72	1.125 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
73	2.25 B1 1	0	0	10	Inoculación no
74	2.25 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
75	2.25 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
76	2.25 B2 1	0	0	10	Inoculación no
77	2.25 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
78	2.25 B2 3	0	0	10	*aeruginosa*
79	2.25 B3 1	0	0	0	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG[d]	Contaje/mL [e]	Observaciones [f]
80	2.25 B3 2	0	0	0	efectiva de *P.*
81	2.25 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
82	2.25 B4 1	0	0	0	Inoculación no
83	2.25 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
84	2.25 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
85	2.25 B5 1	0	0	30	Inoculación no
86	2.25 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*
87	2.25 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
88	2.25 B6 1	0	0	0	Inoculación no
89	2.25 B6 2	0	0	0	efectiva de *P.*
90	2.25 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
91	2.25 B7 1	0	0	0	Inoculación no
92	2.25 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
93	2.25 B7 3	0	0	0	*aeruginosa*
94	2.25 B8 1	0	0	0	Inoculación no
95	2.25 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
96	2.25 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
97	4.5 B1 1	0	0	0	Inoculación no
98	4.5 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
99	4.5 B1 3	0	0	0	*aeruginosa*
100	4.5 B2 1	0	0	0	Inoculación no
101	4.5 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
102	4.5 B2 3	0	0	41	*aeruginosa*
103	4.5 B3 1	0	0	0	Inoculación no
104	4.5 B3 2	0	0	0	efectiva de *P.*
105	4.5 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
106	4.5 B4 1	0	0	10	Inoculación no
107	4.5 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
108	4.5 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
109	4.5 B5 1	0	0	0	Inoculación no
110	4.5 B5 2	0	0	0	efectiva de *P.*
111	4.5 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
112	4.5 B6 1	0	0	0	Inoculación no
113	4.5 B6 2	0	0	0	efectiva de *P.*
114	4.5 B6 3	0	0	10	*aeruginosa*
115	4.5 B7 1	0	0	10	Inoculación no
116	4.5 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
117	4.5 B7 3	0	0	0	*aeruginosa*
118	4.5 B8 1	0	0	0	Inoculación no
119	4.5 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
120	4.5 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*

Tabla VII.3.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Pseudomonas aeruginosa* en gel Nel.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.28125 B1 1	0	0	0	Inoculación no
2	0.28125 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
3	0.28125 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
4	0.28125 B2 1	0	0	0	Inoculación no
5	0.28125 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
6	0.28125 B2 3	0	0	0	*aeruginosa*
7	0.28125 B3 1	0	0	0	Inoculación no
8	0.28125 B3 2	0	0	10	efectiva de *P.*
9	0.28125 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
10	0.28125 B4 1	0	0	10	Inoculación no
11	0.28125 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
12	0.28125 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
13	0.28125 B5 1	0	0	0	Inoculación no
14	0.28125 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*
15	0.28125 B5 3	0	0	10	*aeruginosa*
16	0.28125 B6 1	0	0	10	Inoculación no
17	0.28125 B6 2	0	0	0	efectiva de *P.*
18	0.28125 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
19	0.28125 B7 1	0	0	0	Inoculación no
20	0.28125 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
21	0.28125 B7 3	0	0	10	*aeruginosa*
22	0.28125 B8 1	0	0	20	Inoculación no
23	0.28125 B8 2	0	0	20	efectiva de *P.*
24	0.28125 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
25	0.5625 B1 1	0	0	0	Inoculación no
26	0.5625 B1 2	0	0	10	efectiva de *P.*
27	0.5625 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
28	0.5625 B2 1	0	>300	11878	Inoculación no
29	0.5625 B2 2	0	>300	12383	efectiva de *P.*
30	0.5625 B2 3	0	>300	11446	*aeruginosa*. Otros
31	0.5625 B3 1	0	0	0	Inoculación no
32	0.5625 B3 2	0	0	10	efectiva de *P.*
33	0.5625 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
34	0.5625 B4 1	0	0	10	Inoculación no
35	0.5625 B4 2	0	0	10	efectiva de *P.*
36	0.5625 B4 3	0	0	10	*aeruginosa*
37	0.5625 B5 1	0	0	10	Inoculación no
38	0.5625 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.5625 B5 3	0	0	10	*aeruginosa*
40	0.5625 B6 1	0	0	0	Inoculación no
41	0.5625 B6 2	0	0	20	efectiva de *P.*
42	0.5625 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
43	0.5625 B7 1	0	0	10	Inoculación no
44	0.5625 B7 2	0	0	10	efectiva de *P.*
45	0.5625 B7 3	0	0	10	*aeruginosa*
46	0.5625 B8 1	0	0	20	Inoculación no
47	0.5625 B8 2	0	0	10	efectiva de *P.*
48	0.5625 B8 3	0	0	30	*aeruginosa*
49	1.125 B1 1	0	0	10	Inoculación no
50	1.125 B1 2	0	0	0	efectiva de *P.*
51	1.125 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
52	1.125 B2 1	0	0	10	Inoculación no
53	1.125 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
54	1.125 B2 3	0	0	0	*aeruginosa*
55	1.125 B3 1	0	0	10	Inoculación no
56	1.125 B3 2	0	0	10	efectiva de *P.*
57	1.125 B3 3	0	0	0	*aeruginosa*
58	1.125 B4 1	0	0	10	Inoculación no
59	1.125 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
60	1.125 B4 3	0	0	20	*aeruginosa*
61	1.125 B5 1	0	0	10	Inoculación no
62	1.125 B5 2	0	0	0	efectiva de *P.*
63	1.125 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
64	1.125 B6 1	0	0	0	Inoculación no
65	1.125 B6 2	0	0	10	efectiva de *P.*
66	1.125 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
67	1.125 B7 1	0	0	0	Inoculación no
68	1.125 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
69	1.125 B7 3	0	0	0	*aeruginosa*
70	1.125 B8 1	0	0	10	Inoculación no
71	1.125 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
72	1.125 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
73	2.25 B1 1	0	0	0	Inoculación no
74	2.25 B1 2	0	0	10	efectiva de *P.*
75	2.25 B1 3	0	0	10	*aeruginosa*
76	2.25 B2 1	0	0	0	Inoculación no
77	2.25 B2 2	0	0	0	efectiva de *P.*
78	2.25 B2 3	0	0	10	*aeruginosa*
79	2.25 B3 1	0	>300	9172	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	2.25 B3 2	0	>300	9597	efectiva de *P.*
81	2.25 B3 3	0	>300	7448	*aeruginosa*. Otros
82	2.25 B4 1	0	0	0	Inoculación no
83	2.25 B4 2	0	0	0	efectiva de *P.*
84	2.25 B4 3	0	0	10	*aeruginosa*
85	2.25 B5 1	0	0	0	Inoculación no
86	2.25 B5 2	0	0	10	efectiva de *P.*
87	2.25 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
88	2.25 B6 1	0	0	0	Inoculación no
89	2.25 B6 2	0	0	0	efectiva de *P.*
90	2.25 B6 3	0	0	0	*aeruginosa*
91	2.25 B7 1	0	0	0	Inoculación no
92	2.25 B7 2	0	0	0	efectiva de *P.*
93	2.25 B7 3	0	0	0	*aeruginosa*
94	2.25 B8 1	0	0	0	Inoculación no
95	2.25 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
96	2.25 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*
97	4.5 B1 1	0	>300	3159684	Inoculación no
98	4.5 B1 2	0	>300	3149053	efectiva de *P.*
99	4.5 B1 3	0	>300	3325884	*aeruginosa*. Otros
100	4.5 B2 1	0	0	0	Inoculación no
101	4.5 B2 2	0	0	10	efectiva de *P.*
102	4.5 B2 3	0	0	0	*aeruginosa*
103	4.5 B3 1	0	0	0	Inoculación no
104	4.5 B3 2	0	0	0	efectiva de *P.*
105	4.5 B3 3	0	0	10	*aeruginosa*
106	4.5 B4 1	0	0	0	Inoculación no
107	4.5 B4 2	0	0	10	efectiva de *P.*
108	4.5 B4 3	0	0	0	*aeruginosa*
109	4.5 B5 1	0	0	20	Inoculación no
110	4.5 B5 2	0	0	0	efectiva de *P.*
111	4.5 B5 3	0	0	0	*aeruginosa*
112	4.5 B6 1	0	>300	2116	Inoculación no
113	4.5 B6 2	0	>300	2798	efectiva de *P.*
114	4.5 B6 3	0	>300	2996	*aeruginosa*. Otros
115	4.5 B7 1	0	>300	526	Inoculación no
116	4.5 B7 2	0	>300	395	efectiva de *P.*
117	4.5 B7 3	0	>300	395	*aeruginosa*. Otros
118	4.5 B8 1	0	0	10	Inoculación no
119	4.5 B8 2	0	0	0	efectiva de *P.*
120	4.5 B8 3	0	0	0	*aeruginosa*

VII.4. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en muestras de geles

Leyenda:

- [a, b] **Nomenclatura para la numeración y denominación de muestras:** Las muestras son numeradas arábigamente con arreglo a la posición para el análisis **(columna número)** [a]. La denominación de las muestras se corresponde con la concentración teórica inoculada de microorganismo / número de frasco / número de vial **(columna muestra)** [b] **(Ejemplo:** 0.265 B1 1 se corresponde con una concentración teórica inoculada de 0.265 microorganismos, del frasco número 1 y medida en el vial 1).
- [c] **Método tradicional selectivo (MTS):** resultados correspondientes a la siembra de *Staphylococcus aureus* en medio selectivo Baird Parker y expresados en u.f.c./placa.
- [d] **Método tradicional general (MTG):** resultados correspondientes a la siembra de *Staphylococcus aureus* en medio general TSA y expresados en u.f.c./placa.
- [e] **Contaje/mL:** número de microorganismos contados por el citómetro de flujo.
- [f] **Observaciones:** las muestras clasificadas positivas por el citómetro de flujo se indican en **negrita.**
- Los falsos resultados se marcan en rojo.

Tabla VII.4.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Av. Kin.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.6875 B1 1	0	0	0	
2	0.6875 B1 2	0	0	0	Inoculación no
3	0.6875 B1 3	0	0	10	efectiva de *S.*
4	0.6875 B1 4	0	0	0	*aureus*
5	0.6875 B1 5	0	0	0	
6	**0.6875 B2 1**	**>300**	**>300**	**690**	
7	**0.6875 B2 2**	**>300**	**>300**	**527**	**Inoculación**
8	**0.6875 B2 3**	**>300**	**>300**	**710**	**efectiva de *S.***
9	**0.6875 B2 4**	**>300**	**>300**	**516**	***aureus***
10	**0.6875 B2 5**	**>300**	**>300**	**760**	
11	0.6875 B3 1	0	0	0	
12	0.6875 B3 2	0	0	0	Inoculación no
13	0.6875 B3 3	0	0	0	efectiva de *S.*
14	0.6875 B3 4	0	0	0	*aureus*
15	0.6875 B3 5	0	0	0	
16	0.6875 B4 1	0	0	0	
17	0.6875 B4 2	0	0	20	Inoculación no
18	0.6875 B4 3	0	0	0	efectiva de *S.*
19	0.6875 B4 4	0	0	0	*aureus*
20	0.6875 B4 5	0	0	0	
21	0.6875 B5 1	0	0	20	
22	0.6875 B5 2	0	0	0	Inoculación no
23	0.6875 B5 3	0	0	0	efectiva de *S.*
24	0.6875 B5 4	0	0	0	*aureus*
25	0.6875 B5 5	0	0	0	
26	0.6875 B6 1	0	0	20	
27	0.6875 B6 2	0	0	10	Inoculación no
28	0.6875 B6 3	0	0	10	efectiva de *S.*
29	0.6875 B6 4	0	0	10	*aureus*
30	0.6875 B6 5	0	0	0	
31	0.6875 B7 1	0	0	0	
32	0.6875 B7 2	0	0	0	Inoculación no
33	0.6875 B7 3	0	0	59	efectiva de *S.*
34	0.6875 B7 4	0	0	0	*aureus*
35	0.6875 B7 5	0	0	0	
36	0.6875 B8 1	0	0	0	
37	0.6875 B8 2	0	0	10	Inoculación no
38	0.6875 B8 3	0	0	0	efectiva de *S.*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.6875 B8 4	0	0	10	*aureus*
40	0.6875 B8 5	0	0	41	
41	1.375 B1 1	0	0	41	
42	1.375 B1 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
43	1.375 B1 3	0	0	51	
44	1.375 B1 4	0	0	0	
45	1.375 B1 5	0	0	0	
46	1.375 B2 1	0	0	29	
47	1.375 B2 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
48	1.375 B2 3	0	0	0	
49	1.375 B2 4	0	0	79	
50	1.375 B2 5	0	0	0	
51	1.375 B3 1	0	0	0	
52	1.375 B3 2	0	0	98	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
53	1.375 B3 3	0	0	0	
54	1.375 B3 4	0	0	0	
55	1.375 B3 5	0	0	0	
56	1.375 B4 1	0	0	0	
57	1.375 B4 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
58	1.375 B4 3	0	0	325	
59	1.375 B4 4	0	0	10	
60	1.375 B4 5	0	0	0	
61	**1.375 B5 1**	**>300**	**>300**	**4809**	
62	**1.375 B5 2**	**>300**	**>300**	**4825**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
63	**1.375 B5 3**	**>300**	**>300**	**5350**	
64	**1.375 B5 4**	**>300**	**>300**	**5424**	
65	**1.375 B5 5**	**>300**	**>300**	**4452**	
66	**1.375 B6 1**	**>300**	**>300**	**751**	
67	**1.375 B6 2**	**>300**	**>300**	**579**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
68	**1.375 B6 3**	**>300**	**>300**	**471**	
69	**1.375 B6 4**	**>300**	**>300**	**497**	
70	**1.375 B6 5**	**>300**	**>300**	**426**	
71	**1.375 B7 1**	**>300**	**>300**	**10268**	
72	**1.375 B7 2**	**>300**	**>300**	**10053**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
73	**1.375 B7 3**	**>300**	**>300**	**12811**	
74	**1.375 B7 4**	**>300**	**>300**	**12903**	
75	**1.375 B7 5**	**>300**	**>300**	**12545**	
76	**1.375 B8 1**	**>300**	**>300**	**11094**	
77	**1.375 B8 2**	**>300**	**>300**	**10872**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
78	**1.375 B8 3**	**>300**	**>300**	**12952**	
79	**1.375 B8 4**	**>300**	**>300**	**12822**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	**1.375 B8 5**	**>300**	**>300**	**12618**	
81	**2.75 B1 1**	**>300**	**>300**	**206**	
82	**2.75 B1 2**	**>300**	**>300**	**254**	**Inoculación**
83	**2.75 B1 3**	**>300**	**>300**	**203**	**efectiva de *S.***
84	**2.75 B1 4**	**>300**	**>300**	**233**	***aureus***
85	**2.75 B1 5**	**>300**	**>300**	**152**	
86	**2.75 B2 1**	**>300**	**>300**	**5303**	
87	**2.75 B2 2**	**>300**	**>300**	**5776**	**Inoculación**
88	**2.75 B2 3**	**>300**	**>300**	**5990**	**efectiva de *S.***
89	**2.75 B2 4**	**>300**	**>300**	**5867**	***aureus***
90	**2.75 B2 5**	**>300**	**>300**	**6261**	
91	**2.75 B3 1**	**>300**	**>300**	**11969**	
92	**2.75 B3 2**	**>300**	**>300**	**11492**	**Inoculación**
93	**2.75 B3 3**	**>300**	**>300**	**12282**	**efectiva de *S.***
94	**2.75 B3 4**	**>300**	**>300**	**13537**	***aureus***
95	**2.75 B3 5**	**>300**	**>300**	**13461**	
96	**2.75 B4 1**	**>300**	**>300**	**508**	
97	**2.75 B4 2**	**>300**	**>300**	**461**	**Inoculación**
98	**2.75 B4 3**	**>300**	**>300**	**508**	**efectiva de *S.***
99	**2.75 B4 4**	**>300**	**>300**	**507**	***aureus***
100	**2.75 B4 5**	**>300**	**>300**	**540**	
101	**2.75 B5 1**	**>300**	**>300**	**223**	
102	**2.75 B5 2**	**>300**	**>300**	**284**	**Inoculación**
103	**2.75 B5 3**	**>300**	**>300**	**324**	**efectiva de *S.***
104	**2.75 B5 4**	**>300**	**>300**	**233**	***aureus***
105	**2.75 B5 5**	**>300**	**>300**	**304**	
106	2.75 B6 1	0	0	122	
107	2.75 B6 2	0	0	142	Inoculación no
108	2.75 B6 3	0	0	61	efectiva de *S.*
109	2.75 B6 4	0	0	132	*aureus*
110	2.75 B6 5	0	0	91	
111	2.75 B7 1	0	0	132	
112	2.75 B7 2	0	0	142	Inoculación no
113	2.75 B7 3	0	0	122	efectiva de *S.*
114	2.75 B7 4	0	0	91	*aureus*
115	2.75 B7 5	0	0	132	
116	**2.75 B8 1**	**>300**	**>300**	**2763831**	
117	**2.75 B8 2**	**>300**	**>300**	**2698287**	**Inoculación**
118	**2.75 B8 3**	**>300**	**>300**	**2738616**	**efectiva de *S.***
119	**2.75 B8 4**	**>300**	**>300**	**2781802**	***aureus***
120	**2.75 B8 5**	**>300**	**>300**	**2870941**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	5.5 B1 1	>300	>300	16205	
122	5.5 B1 2	>300	>300	16051	Inoculación
123	5.5 B1 3	>300	>300	17060	efectiva de *S.*
124	5.5 B1 4	>300	>300	17764	*aureus*
125	5.5 B1 5	>300	>300	30542	
126	5.5 B2 1	>300	>300	10333	
127	5.5 B2 2	>300	>300	9629	Inoculación
128	5.5 B2 3	>300	>300	9249	efectiva de *S.*
129	5.5 B2 4	>300	>300	10158	*aureus*
130	5.5 B2 5	>300	>300	10218	
131	5.5 B3 1	>300	>300	69315	
132	5.5 B3 2	>300	>300	86126	Inoculación
133	5.5 B3 3	>300	>300	88617	efectiva de *S.*
134	5.5 B3 4	>300	>300	86398	*aureus*
135	5.5 B3 5	>300	>300	89836	
136	5.5 B4 1	>300	>300	995326	
137	5.5 B4 2	>300	>300	1055799	Inoculación
138	5.5 B4 3	>300	>300	1046006	efectiva de *S.*
139	5.5 B4 4	>300	>300	1061573	*aureus*
140	5.5 B4 5	>300	>300	1124042	
141	5.5 B5 1	>300	>300	2927971	
142	5.5 B5 2	>300	>300	2883247	Inoculación
143	5.5 B5 3	>300	>300	2959576	efectiva de *S.*
144	5.5 B5 4	>300	>300	2916534	*aureus*
145	5.5 B5 5	>300	>300	2961786	
146	5.5 B6 1	>300	>300	1406526	
147	5.5 B6 2	>300	>300	1469001	Inoculación
148	5.5 B6 3	>300	>300	1494785	efectiva de *S.*
149	5.5 B6 4	>300	>300	1488839	*aureus*
150	5.5 B6 5	>300	>300	1611314	
151	5.5 B7 1	>300	>300	1264594	
152	5.5 B7 2	>300	>300	1382314	Inoculación
153	5.5 B7 3	>300	>300	1444487	efectiva de *S.*
154	5.5 B7 4	>300	>300	1598210	*aureus*
155	5.5 B7 5	>300	>300	1557652	
156	5.5 B8 1	>300	>300	3207923	
157	5.5 B8 2	>300	>300	3266848	Inoculación
158	5.5 B8 3	>300	>300	3240588	efectiva de *S.*
159	5.5 B8 4	>300	>300	3371921	*aureus*
160	5.5 B8 5	>300	>300	3321331	
161	11 B1 1	>300	>300	1526043	Inoculación

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
162	11 B1 2	>300	>300	1539794	efectiva de *S. aureus*
163	11 B1 3	>300	>300	1657244	
164	11 B1 4	>300	>300	1592296	
165	11 B1 5	>300	>300	1778573	
166	11 B2 1	>300	>300	1945138	Inoculación efectiva de *S. aureus*
167	11 B2 2	>300	>300	1978902	
168	11 B2 3	>300	>300	2093520	
169	11 B2 4	>300	>300	2025388	
170	11 B2 5	>300	>300	1932140	
171	11 B3 1	>300	>300	911968	Inoculación efectiva de *S. aureus*
172	11 B3 2	>300	>300	1021123	
173	11 B3 3	>300	>300	1047979	
174	11 B3 4	>300	>300	1024968	
175	11 B3 5	>300	>300	1119750	
176	11 B4 1	>300	>300	3730141	Inoculación efectiva de *S. aureus*
177	11 B4 2	>300	>300	3664758	
178	11 B4 3	>300	>300	3758580	
179	11 B4 4	>300	>300	3659331	
180	11 B4 5	>300	>300	3820865	
181	11 B5 1	>300	>300	2557901	Inoculación efectiva de *S. aureus*
182	11 B5 2	>300	>300	2605195	
183	11 B5 3	>300	>300	2530449	
184	11 B5 4	>300	>300	2552616	
185	11 B5 5	>300	>300	2790462	
186	11 B6 1	>300	>300	2827336	Inoculación efectiva de *S. aureus*
187	11 B6 2	>300	>300	3908533	
188	11 B6 3	>300	>300	4030643	
189	11 B6 4	>300	>300	4060699	
190	11 B6 5	>300	>300	4007609	
191	11 B7 1	>300	>300	3795266	Inoculación efectiva de *S. aureus*
192	11 B7 2	>300	>300	3756523	
193	11 B7 3	>300	>300	3597381	
194	11 B7 4	>300	>300	3493488	
195	11 B7 5	>300	>300	3566786	
196	11 B8 1	>300	>300	2801014	Inoculación efectiva de *S. aureus*
197	11 B8 2	>300	>300	3014556	
198	11 B8 3	>300	>300	3054518	
199	11 B8 4	>300	>300	3037335	
200	11 B8 5	>300	>300	3042794	

Tabla VII.4.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Lac.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.36875 B1 1	0	0	121	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
2	0.36875 B1 2	0	0	0	
3	0.36875 B1 3	0	0	10	
4	0.36875 B2 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
5	0.36875 B2 2	0	0	0	
6	0.36875 B2 3	0	0	1696	
7	0.36875 B3 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
8	0.36875 B3 2	0	0	0	
9	0.36875 B3 3	0	0	0	
10	0.36875 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
11	0.36875 B4 2	0	0	0	
12	0.36875 B4 3	0	0	10	
13	0.36875 B5 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
14	0.36875 B5 2	0	0	0	
15	0.36875 B5 3	0	0	0	
16	**0.36875 B6 1**	**>300**	**>300**	**3109502**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
17	**0.36875 B6 2**	**>300**	**>300**	**3079403**	
18	**0.36875 B6 3**	**>300**	**>300**	**2947184**	
19	**0.36875 B7 1**	**>300**	**>300**	**3263544**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
20	**0.36875 B7 2**	**>300**	**>300**	**3307138**	
21	**0.36875 B7 3**	**>300**	**>300**	**3355526**	
22	0.36875 B8 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
23	0.36875 B8 2	0	0	10	
24	0.36875 B8 3	0	0	0	
25	0.7375 B1 1	0	0	910	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
26	0.7375 B1 2	0	0	20	
27	0.7375 B1 3	0	0	0	
28	0.7375 B2 1	0	**>300**	1371160	Inoculación no efectiva de *S. aureus*. Otros
29	0.7375 B2 2	0	**>300**	1340309	
30	0.7375 B2 3	0	**>300**	1398198	
31	**0.7375 B3 1**	**>300**	**>300**	**1112127**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
32	**0.7375 B3 2**	**>300**	**>300**	**1105972**	
33	**0.7375 B3 3**	**>300**	**>300**	**1412642**	
34	**0.7375 B4 1**	**>300**	**>300**	**3608594**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
35	**0.7375 B4 2**	**>300**	**>300**	**3829969**	
36	**0.7375 B4 3**	**>300**	**>300**	**3717225**	
37	**0.7375 B5 1**	**>300**	**>300**	**3110383**	**Inoculación**

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
38	**0.7375 B5 2**	**>300**	**>300**	**3042632**	**efectiva de *S.***
39	**0.7375 B5 3**	**>300**	**>300**	**3053653**	***aureus***
40	**0.7375 B6 1**	**>300**	**>300**	**3623313**	**Inoculación**
41	**0.7375 B6 2**	**>300**	**>300**	**3603230**	**efectiva de *S.***
42	**0.7375 B6 3**	**>300**	**>300**	**3795394**	***aureus***
43	**0.7375 B7 1**	**>300**	**>300**	**2930376**	**Inoculación**
44	**0.7375 B7 2**	**>300**	**>300**	**2834788**	**efectiva de *S.***
45	**0.7375 B7 3**	**>300**	**>300**	**2987113**	***aureus***
46	0.7375 B8 1	0	0	142	Inoculación no
47	0.7375 B8 2	0	0	101	efectiva de *S.*
48	0.7375 B8 3	0	0	152	*aureus*
49	**1.475 B1 1**	**>300**	**>300**	**874926**	**Inoculación**
50	**1.475 B1 2**	**>300**	**>300**	**1028117**	**efectiva de *S.***
51	**1.475 B1 3**	**>300**	**>300**	**984540**	***aureus***
52	**1.475 B2 1**	**>300**	**>300**	**2421416**	**Inoculación**
53	**1.475 B2 2**	**>300**	**>300**	**2491189**	**efectiva de *S.***
54	**1.475 B2 3**	**>300**	**>300**	**2504162**	***aureus***
55	**1.475 B3 1**	**>300**	**>300**	**2699627**	**Inoculación**
56	**1.475 B3 2**	**>300**	**>300**	**2566535**	**efectiva de *S.***
57	**1.475 B3 3**	**>300**	**>300**	**2606260**	***aureus***
58	**1.475 B4 1**	**>300**	**>300**	**2064840**	**Inoculación**
59	**1.475 B4 2**	**>300**	**>300**	**1679811**	**efectiva de *S.***
60	**1.475 B4 3**	**>300**	**>300**	**1519629**	***aureus***
61	**1.475 B5 1**	**>300**	**>300**	**2896104**	**Inoculación**
62	**1.475 B5 2**	**>300**	**>300**	**2797151**	**efectiva de *S.***
63	**1.475 B5 3**	**>300**	**>300**	**3226538**	***aureus***
64	**1.475 B6 1**	**>300**	**>300**	**4010450**	**Inoculación**
65	**1.475 B6 2**	**>300**	**>300**	**3971323**	**efectiva de *S.***
66	**1.475 B6 3**	**>300**	**>300**	**3924113**	***aureus***
67	**1.475 B7 1**	**>300**	**>300**	**3796909**	**Inoculación**
68	**1.475 B7 2**	**>300**	**>300**	**3745930**	**efectiva de *S.***
69	**1.475 B7 3**	**>300**	**>300**	**3563926**	***aureus***
70	**1.475 B8 1**	**>300**	**>300**	**3810850**	**Inoculación**
71	**1.475 B8 2**	**>300**	**>300**	**3732196**	**efectiva de *S.***
72	**1.475 B8 3**	**>300**	**>300**	**3783527**	***aureus***
73	**2.75 B1 1**	**>300**	**>300**	**3227877**	**Inoculación**
74	**2.75 B1 2**	**>300**	**>300**	**3125436**	**efectiva de *S.***
75	**2.75 B1 3**	**>300**	**>300**	**3170024**	***aureus***
76	**2.75 B2 1**	**>300**	**>300**	**3052409**	**Inoculación**
77	**2.75 B2 2**	**>300**	**>300**	**3206299**	**efectiva de *S.***
78	**2.75 B2 3**	**>300**	**>300**	**3145124**	***aureus***

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
79	2.75 B3 1	>300	>300	3092016	Inoculación efectiva de *S. aureus*
80	2.75 B3 2	>300	>300	3033033	
81	2.75 B3 3	>300	>300	2999079	
82	2.75 B4 1	>300	>300	3754113	Inoculación efectiva de *S. aureus*
83	2.75 B4 2	>300	>300	3699775	
84	2.75 B4 3	>300	>300	3806482	
85	2.75 B5 1	>300	>300	3504584	Inoculación efectiva de *S. aureus*
86	2.75 B5 2	>300	>300	3509652	
87	2.75 B5 3	>300	>300	3550940	
88	2.75 B6 1	>300	>300	3114523	Inoculación efectiva de *S. aureus*
89	2.75 B6 2	>300	>300	3128879	
90	2.75 B6 3	>300	>300	3169332	
91	2.75 B7 1	>300	>300	3346555	Inoculación efectiva de *S. aureus*
92	2.75 B7 2	>300	>300	3369752	
93	2.75 B7 3	>300	>300	3421533	
94	2.75 B8 1	>300	>300	3269575	Inoculación efectiva de *S. aureus*
95	2.75 B8 2	>300	>300	3198864	
96	2.75 B8 3	>300	>300	3244698	

Tabla VII.4.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en Dnn.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.36875 B1 1	0	>300	883659	Inoculación no
2	0.36875 B1 2	0	>300	940458	efectiva de *S.*
3	0.36875 B1 3	0	>300	996155	*aureus*. Otros
4	**0.36875 B2 1**	**>300**	**>300**	**327569**	**Inoculación**
5	**0.36875 B2 2**	**>300**	**>300**	**266551**	**efectiva de *S.***
6	**0.36875 B2 3**	**>300**	**>300**	**283683**	***aureus***
7	**0.36875 B3 1**	**>300**	**>300**	**3819**	**Inoculación**
8	**0.36875 B3 2**	**>300**	**>300**	**3677**	**efectiva de *S.***
9	**0.36875 B3 3**	**>300**	**>300**	**3990**	***aureus***
10	0.36875 B4 1	0	0	0	Inoculación no
11	0.36875 B4 2	0	0	0	efectiva de *S.*
12	0.36875 B4 3	0	0	10	*aureus*
13	0.36875 B5 1	0	0	0	Inoculación no
14	0.36875 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
15	0.36875 B5 3	0	0	0	*aureus*
16	**0.36875 B6 1**	**>300**	**>300**	**147705**	**Inoculación**
17	**0.36875 B6 2**	**>300**	**>300**	**129970**	**efectiva de *S.***
18	**0.36875 B6 3**	**>300**	**>300**	**132928**	***aureus***
19	0.36875 B7 1	0	0	20	Inoculación no
20	0.36875 B7 2	0	0	10	efectiva de *S.*
21	0.36875 B7 3	0	0	0	*aureus*
22	**0.36875 B8 1**	**>300**	**>300**	**18677**	**Inoculación**
23	**0.36875 B8 2**	**>300**	**>300**	**20040**	**efectiva de *S.***
24	**0.36875 B8 3**	**>300**	**>300**	**24946**	***aureus***
25	0.7375 B1 1	0	0	0	Inoculación no
26	0.7375 B1 2	0	0	0	efectiva de *S.*
27	0.7375 B1 3	0	0	0	*aureus*
28	0.7375 B2 1	0	0	0	Inoculación no
29	0.7375 B2 2	0	0	10	efectiva de *S.*
30	0.7375 B2 3	0	0	20	*aureus*
31	0.7375 B3 1	0	0	10	Inoculación no
32	0.7375 B3 2	0	0	20	efectiva de *S.*
33	0.7375 B3 3	0	0	0	*aureus*
34	**0.7375 B4 1**	**>300**	**>300**	**14600**	**Inoculación**
35	**0.7375 B4 2**	**>300**	**>300**	**11532**	**efectiva de *S.***
36	**0.7375 B4 3**	**>300**	**>300**	**13844**	***aureus***
37	0.7375 B5 1	0	0	0	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
38	0.7375 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
39	0.7375 B5 3	0	0	0	*aureus*
40	**0.7375 B6 1**	**>300**	**>300**	**7967**	**Inoculación**
41	**0.7375 B6 2**	**>300**	**>300**	**7877**	**efectiva de *S.***
42	**0.7375 B6 3**	**>300**	**>300**	**7653**	***aureus***
43	**0.7375 B7 1**	**>300**	**>300**	**731972**	**Inoculación**
44	**0.7375 B7 2**	**>300**	**>300**	**1042158**	**efectiva de *S.***
45	**0.7375 B7 3**	**>300**	**>300**	**1037067**	***aureus***
46	0.7375 B8 1	0	0	0	Inoculación no
47	0.7375 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
48	0.7375 B8 3	0	0	0	*aureus*
49	**1.475 B1 1**	**>300**	**>300**	**173309**	**Inoculación**
50	**1.475 B1 2**	**>300**	**>300**	**151888**	**efectiva de *S.***
51	**1.475 B1 3**	**>300**	**>300**	**176337**	***aureus***
52	1.475 B2 1	0	0	20	Inoculación no
53	1.475 B2 2	0	0	0	efectiva de *S.*
54	1.475 B2 3	0	0	0	*aureus*
55	**1.475 B3 1**	**>300**	**>300**	**185949**	**Inoculación**
56	**1.475 B3 2**	**>300**	**>300**	**284465**	**efectiva de *S.***
57	**1.475 B3 3**	**>300**	**>300**	**325458**	***aureus***
58	1.475 B4 1	>300	0	152	Inoculación no
59	1.475 B4 2	>300	0	0	efectiva de *S.*
60	1.475 B4 3	>300	0	0	*aureus*
61	**1.475 B5 1**	**26**	**>300**	**1182267**	**Inoculación**
62	**1.475 B5 2**	**26**	**>300**	**1166071**	**efectiva de *S.***
63	**1.475 B5 3**	**26**	**>300**	**1865702**	***aureus.* Otros**
64	**1.475 B6 1**	**>300**	**>300**	**3538843**	**Inoculación**
65	**1.475 B6 2**	**>300**	**>300**	**3722429**	**efectiva de *S.***
66	**1.475 B6 3**	**>300**	**>300**	**3608532**	***aureus***
67	**1.475 B7 1**	**>300**	**>300**	**1694782**	**Inoculación**
68	**1.475 B7 2**	**>300**	**>300**	**1935802**	**efectiva de *S.***
69	**1.475 B7 3**	**>300**	**>300**	**1894130**	***aureus***
70	1.475 B8 1	0	0	0	Inoculación no
71	1.475 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
72	1.475 B8 3	0	0	0	*aureus*
73	**2.75 B1 1**	**>300**	**>300**	**1788266**	**Inoculación**
74	**2.75 B1 2**	**>300**	**>300**	**1828665**	**efectiva de *S.***
75	**2.75 B1 3**	**>300**	**>300**	**1942016**	***aureus***
76	**2.75 B2 1**	**>300**	**>300**	**3226848**	**Inoculación**
77	**2.75 B2 2**	**>300**	**>300**	**3286484**	**efectiva de *S.***
78	**2.75 B2 3**	**>300**	**>300**	**3378410**	***aureus***

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
79	2.75 B3 1	>300	>300	2689197	Inoculación efectiva de *S. aureus*
80	2.75 B3 2	>300	>300	2768041	
81	2.75 B3 3	>300	>300	2810621	
82	2.75 B4 1	>300	>300	3142168	Inoculación efectiva de *S. aureus*
83	2.75 B4 2	>300	>300	3154617	
84	2.75 B4 3	>300	>300	3145945	
85	2.75 B5 1	>300	>300	3469165	Inoculación efectiva de *S. aureus*
86	2.75 B5 2	>300	>300	3620560	
87	2.75 B5 3	>300	>300	3492204	
88	2.75 B6 1	>300	>300	22346	Inoculación efectiva de *S. aureus*
89	2.75 B6 2	>300	>300	24827	
90	2.75 B6 3	>300	>300	24767	
91	2.75 B7 1	>300	>300	3486789	Inoculación efectiva de *S. aureus*
92	2.75 B7 2	>300	>300	3405069	
93	2.75 B7 3	>300	>300	3404144	
94	2.75 B8 1	>300	>300	3928490	Inoculación efectiva de *S. aureus*
95	2.75 B8 2	>300	>300	3941019	
96	2.75 B8 3	>300	>300	4080261	

Tabla VII.4.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en Ger.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.36875 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
2	0.36875 B1 2	0	0	29	
3	0.36875 B1 3	0	0	0	
4	0.36875 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
5	0.36875 B2 2	0	0	0	
6	0.36875 B2 3	0	0	0	
7	0.36875 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
8	0.36875 B3 2	0	0	0	
9	0.36875 B3 3	0	0	0	
10	0.36875 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
11	0.36875 B4 2	0	0	0	
12	0.36875 B4 3	0	0	0	
13	0.36875 B5 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
14	0.36875 B5 2	0	0	0	
15	0.36875 B5 3	0	0	10	
16	0.36875 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
17	0.36875 B6 2	0	0	0	
18	0.36875 B6 3	0	0	0	
19	0.36875 B7 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
20	0.36875 B7 2	0	0	0	
21	0.36875 B7 3	0	0	0	
22	0.36875 B8 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
23	0.36875 B8 2	0	0	0	
24	0.36875 B8 3	0	0	0	
25	0.7375 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
26	0.7375 B1 2	0	0	0	
27	0.7375 B1 3	0	0	0	
28	0.7375 B2 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
29	0.7375 B2 2	0	0	49	
30	0.7375 B2 3	0	0	0	
31	0.7375 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
32	0.7375 B3 2	0	0	0	
33	0.7375 B3 3	0	0	0	
34	0.7375 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
35	0.7375 B4 2	0	0	0	
36	0.7375 B4 3	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
37	0.7375 B5 1	0	0	0	Inoculación no
38	0.7375 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
39	0.7375 B5 3	0	0	0	*aureus*
40	0.7375 B6 1	0	0	0	Inoculación no
41	0.7375 B6 2	0	0	0	efectiva de *S.*
42	0.7375 B6 3	0	0	0	*aureus*
43	0.7375 B7 1	0	0	0	Inoculación no
44	0.7375 B7 2	0	0	0	efectiva de *S.*
45	0.7375 B7 3	0	0	0	*aureus*
46	0.7375 B8 1	0	0	0	Inoculación no
47	0.7375 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
48	0.7375 B8 3	0	0	10	*aureus*
49	1.475 B1 1	0	0	0	Inoculación no
50	1.475 B1 2	0	0	0	efectiva de *S.*
51	1.475 B1 3	0	0	0	*aureus*
52	1.475 B2 1	0	0	0	Inoculación no
53	1.475 B2 2	0	0	0	efectiva de *S.*
54	1.475 B2 3	0	0	0	*aureus*
55	1.475 B3 1	0	0	0	Inoculación no
56	1.475 B3 2	0	0	0	efectiva de *S.*
57	1.475 B3 3	0	0	0	*aureus*
58	1.475 B4 1	0	0	0	Inoculación no
59	1.475 B4 2	0	0	0	efectiva de *S.*
60	1.475 B4 3	0	0	20	*aureus*
61	1.475 B5 1	0	0	10	Inoculación no
62	1.475 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
63	1.475 B5 3	0	0	29	*aureus*
64	1.475 B6 1	0	0	10	Inoculación no
65	1.475 B6 2	0	0	10	efectiva de *S.*
66	1.475 B6 3	0	0	20	*aureus*
67	1.475 B7 1	0	0	0	Inoculación no
68	1.475 B7 2	0	0	20	efectiva de *S.*
69	1.475 B7 3	0	0	0	*aureus*
70	1.475 B8 1	0	0	0	Inoculación no
71	1.475 B8 2	0	0	39	efectiva de *S.*
72	1.475 B8 3	0	0	10	*aureus*
73	2.75 B1 1	0	0	10	Inoculación no
74	2.75 B1 2	0	0	0	efectiva de *S.*
75	2.75 B1 3	0	0	10	*aureus*
76	2.75 B2 1	0	0	10	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
77	2.75 B2 2	0	0	0	efectiva de *S.*
78	2.75 B2 3	0	0	10	*aureus*
79	2.75 B3 1	0	0	10	Inoculación no
80	2.75 B3 2	0	0	10	efectiva de *S.*
81	2.75 B3 3	0	0	10	*aureus*
82	2.75 B4 1	0	0	0	Inoculación no
83	2.75 B4 2	0	0	0	efectiva de *S.*
84	2.75 B4 3	0	0	0	*aureus*
85	2.75 B5 1	0	0	0	Inoculación no
86	2.75 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
87	2.75 B5 3	0	0	10	*aureus*
88	2.75 B6 1	0	0	49	Inoculación no
89	2.75 B6 2	0	0	30	efectiva de *S.*
90	2.75 B6 3	0	0	0	*aureus*
91	2.75 B7 1	0	0	0	Inoculación no
92	2.75 B7 2	0	0	0	efectiva de *S.*
93	2.75 B7 3	0	0	0	*aureus*
94	2.75 B8 1	0	0	20	Inoculación no
95	2.75 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
96	2.75 B8 3	0	0	0	*aureus*
97	5.9 B1 1	0	0	0	Inoculación no
98	5.9 B1 2	0	0	10	efectiva de *S.*
99	5.9 B1 3	0	0	0	*aureus*
100	5.9 B2 1	0	0	20	Inoculación no
101	5.9 B2 2	0	0	10	efectiva de *S.*
102	5.9 B2 3	0	0	10	*aureus*
103	5.9 B3 1	0	0	39	Inoculación no
104	5.9 B3 2	0	0	0	efectiva de *S.*
105	5.9 B3 3	0	0	0	*aureus*
106	5.9 B4 1	0	0	0	Inoculación no
107	5.9 B4 2	0	0	10	efectiva de *S.*
108	5.9 B4 3	0	0	10	*aureus*
109	5.9 B5 1	0	0	0	Inoculación no
110	5.9 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
111	5.9 B5 3	0	0	0	*aureus*
112	5.9 B6 1	0	0	0	Inoculación no
113	5.9 B6 2	0	0	10	efectiva de *S.*
114	5.9 B6 3	0	0	0	*aureus*
115	5.9 B7 1	0	0	0	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
116	5.9 B7 2	0	0	10	efectiva de *S. aureus*
117	5.9 B7 3	0	0	0	
118	5.9 B8 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*
119	5.9 B8 2	0	0	0	
120	5.9 B8 3	0	0	0	

Tabla VII.4.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Staphylococcus aureus* en gel Nel.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.36875 B1 1	0	0	0	Inoculación no
2	0.36875 B1 2	0	0	0	efectiva de *S.*
3	0.36875 B1 3	0	0	0	*aureus*
4	0.36875 B2 1	0	0	10	Inoculación no
5	0.36875 B2 2	0	0	0	efectiva de *S.*
6	0.36875 B2 3	0	0	81	*aureus*
7	**0.36875 B3 1**	**>300**	**>300**	**3170**	**Inoculación**
8	**0.36875 B3 2**	**>300**	**>300**	**3767**	**efectiva de *S.***
9	**0.36875 B3 3**	**>300**	**>300**	**3992**	***aureus***
10	**0.36875 B4 1**	**>300**	**>300**	**39283**	**Inoculación**
11	**0.36875 B4 2**	**>300**	**>300**	**44606**	**efectiva de *S.***
12	**0.36875 B4 3**	**>300**	**>300**	**46754**	***aureus***
13	0.36875 B5 1	0	0	0	Inoculación no
14	0.36875 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
15	0.36875 B5 3	0	0	0	*aureus*
16	0.36875 B6 1	0	<200	152	Inoculación no
17	0.36875 B6 2	0	<200	71	efectiva de *S.*
18	0.36875 B6 3	0	<200	118	*aureus*. Otros
19	0.36875 B7 1	0	0	0	Inoculación no
20	0.36875 B7 2	0	0	0	efectiva de *S.*
21	0.36875 B7 3	0	0	0	*aureus*
22	0.36875 B8 1	0	0	0	Inoculación no
23	0.36875 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
24	0.36875 B8 3	0	0	0	*aureus*
25	0.7375 B1 1	0	0	0	Inoculación no
26	0.7375 B1 2	0	0	0	efectiva de *S.*
27	0.7375 B1 3	0	0	0	*aureus*
28	0.7375 B2 1	0	0	0	Inoculación no
29	0.7375 B2 2	0	0	0	efectiva de *S.*
30	0.7375 B2 3	0	0	314	*aureus*
31	0.7375 B3 1	0	0	0	Inoculación no
32	0.7375 B3 2	0	0	0	efectiva de *S.*
33	0.7375 B3 3	0	0	20	*aureus*
34	0.7375 B4 1	0	0	10	Inoculación no
35	0.7375 B4 2	0	0	20	efectiva de *S.*
36	0.7375 B4 3	0	0	39	*aureus*
37	0.7375 B5 1	0	0	0	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
38	0.7375 B5 2	0	0	0	efectiva de *S.*
39	0.7375 B5 3	0	0	0	*aureus*
40	0.7375 B6 1	0	0	20	Inoculación no
41	0.7375 B6 2	0	0	0	efectiva de *S.*
42	0.7375 B6 3	0	0	0	*aureus*
43	0.7375 B7 1	0	0	0	Inoculación no
44	0.7375 B7 2	0	0	0	efectiva de *S.*
45	0.7375 B7 3	0	0	0	*aureus*
46	0.7375 B8 1	0	0	0	Inoculación no
47	0.7375 B8 2	0	0	0	efectiva de *S.*
48	0.7375 B8 3	0	0	10	*aureus*
49	**1.475 B1 1**	**>300**	**>300**	**885136**	**Inoculación**
50	**1.475 B1 2**	**>300**	**>300**	**886996**	**efectiva de *S.***
51	**1.475 B1 3**	**>300**	**>300**	**1020245**	***aureus***
52	**1.475 B2 1**	**>300**	**>300**	**1164035**	**Inoculación**
53	**1.475 B2 2**	**>300**	**>300**	**1093331**	**efectiva de *S.***
54	**1.475 B2 3**	**>300**	**>300**	**943016**	***aureus***
55	**1.475 B3 1**	**>300**	**>300**	**756**	**Inoculación**
56	**1.475 B3 2**	**>300**	**>300**	**717**	**efectiva de *S.***
57	**1.475 B3 3**	**>300**	**>300**	**1149**	***aureus***
58	**1.475 B4 1**	**>300**	**>300**	**25694**	**Inoculación**
59	**1.475 B4 2**	**>300**	**>300**	**17140**	**efectiva de *S.***
60	**1.475 B4 3**	**>300**	**>300**	**20104**	***aureus***
61	**1.475 B5 1**	**>300**	**>300**	**1252248**	**Inoculación**
62	**1.475 B5 2**	**>300**	**>300**	**1365252**	**efectiva de *S.***
63	**1.475 B5 3**	**>300**	**>300**	**3024434**	***aureus***
64	1.475 B6 1	0	0	0	Inoculación no
65	1.475 B6 2	0	0	0	efectiva de *S.*
66	1.475 B6 3	0	0	0	*aureus*
67	**1.475 B7 1**	**>300**	**>300**	**2680933**	**Inoculación**
68	**1.475 B7 2**	**>300**	**>300**	**2838434**	**efectiva de *S.***
69	**1.475 B7 3**	**>300**	**>300**	**2753755**	***aureus***
70	**1.475 B8 1**	**>300**	**>300**	**148703**	**Inoculación**
71	**1.475 B8 2**	**>300**	**>300**	**178762**	**efectiva de *S.***
72	**1.475 B8 3**	**>300**	**>300**	**184378**	***aureus***
73	**2.75 B1 1**	**>300**	**>300**	**241102**	**Inoculación**
74	**2.75 B1 2**	**>300**	**>300**	**272859**	**efectiva de *S.***
75	**2.75 B1 3**	**>300**	**>300**	**282269**	***aureus***
76	**2.75 B2 1**	**>300**	**>300**	**2482983**	**Inoculación**
77	**2.75 B2 2**	**>300**	**>300**	**2519124**	**efectiva de *S.***
78	**2.75 B2 3**	**>300**	**>300**	**2676326**	***aureus***

Número[a]	**Muestra** [b]	**MTS** [c]	**MTG** [d]	**Contaje/mL**[e]	**Observaciones** [f]
79	**2.75 B3 1**	**>300**	**>300**	**3710539**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
80	**2.75 B3 2**	**>300**	**>300**	**3770674**	
81	**2.75 B3 3**	**>300**	**>300**	**3589059**	
82	**2.75 B4 1**	**>300**	**>300**	**3726753**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
83	**2.75 B4 2**	**>300**	**>300**	**3885884**	
84	**2.75 B4 3**	**>300**	**>300**	**3911248**	
85	**2.75 B5 1**	**>300**	**>300**	**3245379**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
86	**2.75 B5 2**	**>300**	**>300**	**3151259**	
87	**2.75 B5 3**	**>300**	**>300**	**3243568**	
88	**2.75 B6 1**	**>300**	**>300**	**2201186**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
89	**2.75 B6 2**	**>300**	**>300**	**1858661**	
90	**2.75 B6 3**	**>300**	**>300**	**1841289**	
91	**2.75 B7 1**	**>300**	**>300**	**2843067**	**Inoculación efectiva de *S. aureus***
92	**2.75 B7 2**	**>300**	**>300**	**2942874**	
93	**2.75 B7 3**	**>300**	**>300**	**2929511**	
94	2.75 B8 1	0	96	10	Inoculación no efectiva de *S. aureus*. Otros
95	2.75 B8 2	0	96	128	
96	2.75 B8 3	0	96	10	

VII.5. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en muestras de geles

Leyenda:

- [a, b] **Nomenclatura para la numeración y denominación de muestras:** Las muestras son numeradas arábigamente con arreglo a la posición para el análisis **(columna número)** [a]. La denominación de las muestras se corresponde con la concentración teórica inoculada de microorganismo/número de frasco/número de vial **(columna muestra)** [b] **(Ejemplo:** 0.265 B1 1 se corresponde con una concentración teórica inoculada de 0.265 microorganismos, del frasco número 1 y medida en el vial 1).
- [c] **Método tradicional selectivo (MTS):** resultados correspondientes a la siembra de *Escherichia coli* en medio selectivo Levine y expresados en u.f.c./placa
- [d] **Método tradicional general (MTG):** resultados correspondientes a la siembra de *Escherichia coli* en medio general TSA y expresados en u.f.c./placa
- [e] **Contaje/mL**: número de microorganismos contados por el citómetro de flujo.
- [f] **Observaciones:** las muestras clasificadas positivas por el citómetro de flujo se indican en **negrita.**
- Los falsos resultados se marcan en rojo.

Tabla VII.5.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Av. Kin.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	**0.625 B1 1**	**>300**	**>300**	**3160925**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
2	**0.625 B1 2**	**>300**	**>300**	**3298861**	
3	**0.625 B1 3**	**>300**	**>300**	**3374483**	
4	**0.625 B1 4**	**>300**	**>300**	**3324443**	
5	**0.625 B1 5**	**>300**	**>300**	**3351531**	
6	0.625 B2 1	0	0	30	Inoculación no efectiva de *E. coli*
7	0.625 B2 2	0	0	10	
8	0.625 B2 3	0	0	0	
9	0.625 B2 4	0	0	10	
10	0.625 B2 5	0	0	10	
11	0.625 B3 1	0	0	30	Inoculación no efectiva de *E. coli*
12	0.625 B3 2	0	0	0	
13	0.625 B3 3	0	0	10	
14	0.625 B3 4	0	0	0	
15	0.625 B3 5	0	0	49	
16	0.625 B4 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *E. coli*
17	0.625 B4 2	0	0	10	
18	0.625 B4 3	0	0	20	
19	0.625 B4 4	0	0	10	
20	0.625 B4 5	0	0	0	
21	0.625 B5 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *E. coli*
22	0.625 B5 2	0	0	51	
23	0.625 B5 3	0	0	39	
24	0.625 B5 4	0	0	10	
25	0.625 B5 5	0	0	10	
26	0.625 B6 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *E. coli*
27	0.625 B6 2	0	0	20	
28	0.625 B6 3	0	0	20	
29	0.625 B6 4	0	0	20	
30	0.625 B6 5	0	0	206	
31	0.625 B7 1	0	0	59	Inoculación no efectiva de *E. coli*
32	0.625 B7 2	0	0	79	
33	0.625 B7 3	0	0	69	
34	0.625 B7 4	0	0	162	
35	0.625 B7 5	0	0	81	
36	0.625 B8 1	0	0	69	Inoculación no efectiva de *E. coli*
37	0.625 B8 2	0	0	137	
38	0.625 B8 3	0	0	118	
39	0.625 B8 4	0	0	137	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
40	0.625 B8 5	0	0	138	
41	1.25 B1 1	0	0	20	
42	1.25 B1 2	0	0	10	Inoculación no
43	1.25 B1 3	0	0	30	efectiva de *E.*
44	1.25 B1 4	0	0	20	*coli*
45	1.25 B1 5	0	0	0	
46	**1.25 B2 1**	**>300**	**>300**	**4335068**	
47	**1.25 B2 2**	**>300**	**>300**	**4244387**	**Inoculación**
48	**1.25 B2 3**	**>300**	**>300**	**4155384**	**efectiva de *E.***
49	**1.25 B2 4**	**>300**	**>300**	**4233544**	***coli***
50	**1.25 B2 5**	**>300**	**>300**	**4484912**	
51	**1.25 B3 1**	**>300**	**>300**	**4223468**	
52	**1.25 B3 2**	**>300**	**>300**	**4185123**	**Inoculación**
53	**1.25 B3 3**	**>300**	**>300**	**4245565**	**efectiva de *E.***
54	**1.25 B3 4**	**>300**	**>300**	**4366528**	***coli***
55	**1.25 B3 5**	**>300**	**>300**	**4265779**	
56	1.25 B4 1	0	0	10	
57	1.25B4 2	0	0	10	Inoculación no
58	1.25 B4 2	0	0	0	efectiva de *E.*
59	1.25 B4 3	0	0	10	*coli*
60	1.25 B4 3	0	0	39	
61	1.25 B5 1	0	0	20	
62	1.25 B5 2	0	0	10	Inoculación no
63	1.25 B5 3	0	0	39	efectiva de *E.*
64	1.25 B5 4	0	0	10	*coli*
65	1.25 B5 5	0	0	59	
66	**1.25 B6 1**	**>300**	**>300**	**4308509**	
67	**1.25 B6 2**	**>300**	**>300**	**4131248**	**Inoculación**
68	**1.25 B6 3**	**>300**	**>300**	**4321658**	**efectiva de *E.***
69	**1.25 B6 4**	**>300**	**>300**	**4325072**	***coli***
70	**1.25 B6 5**	**>300**	**>300**	**4169201**	
71	1.25 B7 1	0	0	344	
72	1.25 B7 2	0	0	20	Inoculación no
73	1.25 B7 3	0	0	167	efectiva de *E.*
74	1.25 B7 4	0	0	20	*coli*
75	1.25 B7 5	0	0	88	
76	1.25 B8 1	0	0	39	
77	1.25 B8 2	0	0	20	Inoculación no
78	1.25 B8 3	0	0	10	efectiva de *E.*
79	1.25 B8 4	0	0	29	*coli*
80	1.25 B8 5	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
81	2.5 B1 1	>300	>300	4254824	
82	2.5 B1 2	>300	>300	4191606	Inoculación
83	2.5 B1 3	>300	>300	4331103	efectiva de *E.*
84	2.5 B1 4	>300	>300	4279015	*coli*
85	2.5 B1 5	>300	>300	4467828	
86	2.5 B2 1	>300	>300	4648150	
87	2.5 B2 2	>300	>300	4656956	Inoculación
88	2.5 B2 3	>300	>300	4577282	efectiva de *E.*
89	2.5 B2 4	>300	>300	4631669	*coli*
90	2.5 B2 5	>300	>300	4631973	
91	2.5 B3 1	>300	>300	4486701	
92	2.5 B3 2	>300	>300	4475529	Inoculación
93	2.5 B3 3	>300	>300	4542996	efectiva de *E.*
94	2.5 B3 4	>300	>300	4484208	*coli*
95	2.5 B3 5	>300	>300	4536942	
96	2.5 B4 1	>300	>300	4599470	
97	2.5 B4 2	>300	>300	4706048	Inoculación
98	2.5 B4 3	>300	>300	4620002	efectiva de *E.*
99	2.5 B4 4	>300	>300	4709584	*coli*
100	2.5 B4 5	>300	>300	4735372	
101	2.5 B5 1	>300	>300	4753021	
102	2.5 B5 2	>300	>300	4646075	Inoculación
103	2.5 B5 3	>300	>300	4691662	efectiva de *E.*
104	2.5 B5 4	>300	>300	4555319	*coli*
105	2.5 B5 5	>300	>300	4600454	
106	2.5 B6 1	>300	>300	4519384	
107	2.5 B6 2	>300	>300	4629168	Inoculación
108	2.5 B6 3	>300	>300	4737171	efectiva de *E.*
109	2.5 B6 4	>300	>300	4682670	*coli*
110	2.5 B6 5	>300	>300	4757919	
111	2.5 B7 1	>300	>300	4637164	
112	2.5 B7 2	>300	>300	4763634	Inoculación
113	2.5 B7 3	>300	>300	4606307	efectiva de *E.*
114	2.5 B7 4	>300	>300	4768708	*coli*
115	2.5 B7 5	>300	>300	4763617	
116	2.5 B8 1	>300	>300	4535455	
117	2.5 B8 2	>300	>300	4668921	Inoculación
118	2.5 B8 3	>300	>300	4568899	efectiva de *E.*
119	2.5 B8 4	>300	>300	4657789	*coli*
120	2.5 B8 5	>300	>300	4587832	
121	5 B1 1	>300	>300	4133598	Inoculación

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
122	5 B1 2	>300	>300	4153369	efectiva de *E.*
123	5 B1 3	>300	>300	4115986	*coli*
124	5 B1 4	>300	>300	4054698	
125	5 B1 5	>300	>300	4146448	
126	5 B2 1	>300	>300	4087493	
127	5 B2 2	>300	>300	4236912	Inoculación
128	5 B2 3	>300	>300	4146955	efectiva de *E.*
129	5 B2 4	>300	>300	4052488	*coli*
130	5 B2 5	>300	>300	4082934	
131	5 B3 1	>300	>300	4048458	
132	5 B3 2	>300	>300	4041909	Inoculación
133	5 B3 3	>300	>300	4101113	efectiva de *E.*
134	5 B3 4	>300	>300	4201590	*coli*
135	5 B3 5	>300	>300	4236124	
136	5 B4 1	>300	>300	4178690	
137	5 B4 2	>300	>300	4229112	Inoculación
138	5 B4 3	>300	>300	4050532	efectiva de *E.*
139	5 B4 4	>300	>300	4248130	*coli*
140	5 B4 5	>300	>300	4386542	
141	5 B5 1	>300	>300	3948313	
142	5 B5 2	>300	>300	4160970	Inoculación
143	5 B5 3	>300	>300	4012692	efectiva de *E.*
144	5 B5 4	>300	>300	4146888	*coli*
145	5 B5 5	>300	>300	4296113	
146	5 B6 1	>300	>300	4389903	
147	5 B6 2	>300	>300	4416811	Inoculación
148	5 B6 3	>300	>300	4260747	efectiva de *E.*
149	5 B6 4	>300	>300	4427904	*coli*
150	5 B6 5	>300	>300	4389415	
151	5 B7 1	>300	>300	4581364	
152	5 B7 2	>300	>300	4599254	Inoculación
153	5 B7 3	>300	>300	4585503	efectiva de *E.*
154	5 B7 4	>300	>300	4420860	*coli*
155	5 B7 5	>300	>300	4473879	
156	5 B8 1	>300	>300	4621005	
157	5 B8 2	>300	>300	4644975	Inoculación
158	5 B8 3	>300	>300	4470679	efectiva de *E.*
159	5 B8 4	>300	>300	4593779	*coli*
160	5 B8 5	>300	>300	4710986	
161	10 B1 1	>300	>300	4533845	Inoculación
162	10 B1 2	>300	>300	4631087	efectiva de *E.*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
163	10 B1 3	>300	>300	4709005	*coli*
164	10 B1 4	>300	>300	4398289	
165	10 B1 5	>300	>300	4532774	
166	10 B2 1	>300	>300	4558991	
167	10 B2 2	>300	>300	4631700	Inoculación
168	10 B2 3	>300	>300	4529209	efectiva de *E.*
169	10 B2 4	>300	>300	4488838	*coli*
170	10 B2 5	>300	>300	4515942	
171	10 B3 1	>300	>300	4724648	
172	10 B3 2	>300	>300	4670240	Inoculación
173	10 B3 3	>300	>300	4669614	efectiva de *E.*
174	10 B3 4	>300	>300	4717224	*coli*
175	10 B3 5	>300	>300	4637886	
176	10 B4 1	>300	>300	4577112	
177	10 B4 2	>300	>300	4651237	Inoculación
178	10 B4 3	>300	>300	4623258	efectiva de *E.*
179	10 B4 4	>300	>300	4698352	*coli*
180	10 B4 5	>300	>300	4615753	
181	10 B5 1	>300	>300	4451871	
182	10 B5 2	>300	>300	4411362	Inoculación
183	10 B5 3	>300	>300	4533885	efectiva de *E.*
184	10 B5 4	>300	>300	4554659	*coli*
185	10 B5 5	>300	>300	4414539	
186	10 B6 1	>300	>300	4786848	
187	10 B6 2	>300	>300	4654240	Inoculación
188	10 B6 3	>300	>300	4663614	efectiva de *E.*
189	10 B6 4	>300	>300	4717334	*coli*
190	10 B6 5	>300	>300	4638986	
191	10 B7 1	>300	>300	4574212	
192	10 B7 2	>300	>300	4659637	Inoculación
193	10 B7 3	>300	>300	4625458	efectiva de *E.*
194	10 B7 4	>300	>300	4692852	*coli*
195	10 B7 5	>300	>300	4619953	
196	10 B8 1	>300	>300	4451271	
197	10 B8 2	>300	>300	4514562	Inoculación
198	10 B8 3	>300	>300	4534395	efectiva de *E.*
199	10 B8 4	>300	>300	4558739	*coli*
200	10 B8 5	>300	>300	4443288	

Tabla VII.5.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Lac.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.281 B1 1	0	0	137	Inoculación no efectiva de *E. coli*
2	0.281 B1 2	0	0	0	
3	0.281 B1 3	0	0	0	
4	0.281 B1 4	0	0	0	
5	0.281 B1 5	0	0	20	
6	0.281 B2 1	0	>300	295435	Inoculación no efectiva de *E. coli*. Otros microorganismos distintos a *E. coli*
7	0.281 B2 2	0	>300	293983	
8	0.281 B2 3	0	>300	359884	
9	0.281 B2 4	0	>300	297604	
10	0.281 B2 5	0	>300	322620	
11	0.281 B3 1	0	0	234	Inoculación no efectiva de *E. coli*
12	0.281 B3 2	0	0	0	
13	0.281 B3 3	0	0	10	
14	0.281 B3 4	0	0	20	
15	0.281 B3 5	0	0	0	
16	**0.281 B4 1**	**>300**	**>300**	**4689624**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
17	**0.281 B4 2**	**>300**	**>300**	**4738015**	
18	**0.281 B4 3**	**>300**	**>300**	**4719541**	
19	**0.281 B4 4**	**>300**	**>300**	**4805737**	
20	**0.281 B4 5**	**>300**	**>300**	**4735421**	
21	0.281 B5 1	0	0	386	Inoculación no efectiva de *E. coli*
22	0.281 B5 2	0	0	0	
23	0.281 B5 3	0	0	41	
24	0.281 B5 4	0	0	10	
25	0.281 B5 5	0	0	0	
26	0.281 B6 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *E. coli*
27	0.281 B6 2	0	0	10	
28	0.281 B6 3	0	0	0	
29	0.281 B6 4	0	0	0	
30	0.281 B6 5	0	0	0	
31	**0.281 B7 1**	**>300**	**>300**	**4357258**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
32	**0.281 B7 2**	**>300**	**>300**	**4552674**	
33	**0.281 B7 3**	**>300**	**>300**	**4467933**	
34	**0.281 B7 4**	**>300**	**>300**	**4435891**	
35	**0.281 B7 5**	**>300**	**>300**	**4425570**	
36	**0.281 B8 1**	**>300**	**>300**	**4291987**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
37	**0.281 B8 2**	**>300**	**>300**	**4522316**	
38	**0.281 B8 3**	**>300**	**>300**	**4397817**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	**0.281 B8 4**	**>300**	**>300**	**4460826**	
40	**0.281 B8 5**	**>300**	**>300**	**4444180**	
41	0.5625 B1 1	0	0	393	Inoculación no efectiva de *E. coli*
42	0.5625 B1 2	0	0	20	
43	0.5625 B1 3	0	0	10	
44	0.5625 B1 4	0	0	49	
45	0.5625 B1 5	0	0	0	
46	0.5625 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
47	0.5625 B2 2	0	0	0	
48	0.5625 B2 3	0	0	0	
49	0.5625 B2 4	0	0	10	
50	0.5625 B2 5	0	0	0	
51	0.5625 B3 1	0	0	29	Inoculación no efectiva de *E. coli*
52	0.5625 B3 2	0	0	0	
53	0.5625 B3 3	0	0	41	
54	0.5625 B3 4	0	0	0	
55	0.5625 B3 5	0	0	0	
56	0.5625 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
57	0.5625 B4 2	0	0	0	
58	0.5625 B4 3	0	0	0	
59	0.5625 B4 4	0	0	0	
60	0.5625 B4 5	0	0	0	
61	0.5625 B5 1	0	0	81	Inoculación no efectiva de *E. coli*
62	0.5625 B5 2	0	0	0	
63	0.5625 B5 3	0	0	10	
64	0.5625 B5 4	0	0	10	
65	0.5625 B5 5	0	0	0	
66	0.5625 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
67	0.5625 B6 2	0	0	0	
68	0.5625 B6 3	0	0	0	
69	0.5625 B6 4	0	0	10	
70	0.5625 B6 5	0	0	20	
71	**0.5625 B7 1**	**>300**	**>300**	**4668623**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
72	**0.5625 B7 2**	**>300**	**>300**	**4742747**	
73	**0.5625 B7 3**	**>300**	**>300**	**4829144**	
74	**0.5625 B7 4**	**>300**	**>300**	**4827904**	
75	**0.5625 B7 5**	**>300**	**>300**	**4779608**	
76	**0.5625 B8 1**	**>300**	**>300**	**4747159**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
77	**0.5625 B8 2**	**>300**	**>300**	**4710137**	
78	**0.5625 B8 3**	**>300**	**>300**	**4737495**	
79	**0.5625 B8 4**	**>300**	**>300**	**4723973**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	**0.5625 B8 5**	**>300**	**>300**	**4627604**	
81	**1.125 B1 1**	**>300**	**>300**	**4548542**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
82	**1.125 B1 2**	**>300**	**>300**	**4629816**	
83	**1.125 B1 3**	**>300**	**>300**	**4575068**	
84	**1.125 B1 4**	**>300**	**>300**	**4532785**	
85	**1.125 B1 5**	**>300**	**>300**	**4610745**	
86	1.125 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
87	1.125 B2 2	0	0	10	
88	1.125 B2 3	0	0	0	
89	1.125 B2 4	0	0	0	
90	1.125 B2 5	0	0	0	
91	**1.125 B3 1**	**>300**	**>300**	**4230132**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
92	**1.125 B3 2**	**>300**	**>300**	**4330658**	
93	**1.125 B3 3**	**>300**	**>300**	**4445060**	
94	**1.125 B3 4**	**>300**	**>300**	**4465064**	
95	**1.125 B3 5**	**>300**	**>300**	**4574022**	
96	**1.125 B4 1**	**>300**	**>300**	**4393678**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
97	**1.125 B4 2**	**>300**	**>300**	**4543411**	
98	**1.125 B4 3**	**>300**	**>300**	**4622796**	
99	**1.125 B4 4**	**>300**	**>300**	**4557212**	
100	**1.125 B4 5**	**>300**	**>300**	**4706277**	
101	**1.125 B5 1**	**>300**	**>300**	**4415976**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
102	**1.125 B5 2**	**>300**	**>300**	**4602234**	
103	**1.125 B5 3**	**>300**	**>300**	**4611490**	
104	**1.125 B5 4**	**>300**	**>300**	**4708007**	
105	**1.125 B5 5**	**>300**	**>300**	**4695212**	
106	**1.125 B6 1**	**>300**	**>300**	**4726825**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
107	**1.125 B6 2**	**>300**	**>300**	**4833424**	
108	**1.125 B6 3**	**>300**	**>300**	**4752441**	
109	**1.125 B6 4**	**>300**	**>300**	**4840189**	
110	**1.125 B6 5**	**>300**	**>300**	**4917930**	
111	**1.125 B7 1**	**>300**	**>300**	**4690189**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
112	**1.125 B7 2**	**>300**	**>300**	**4788333**	
113	**1.125 B7 3**	**>300**	**>300**	**4815302**	
114	**1.125 B7 4**	**>300**	**>300**	**4824791**	
115	**1.125 B7 5**	**>300**	**>300**	**4828581**	
116	1.125 B8 1	0	0	393	Inoculación no efectiva de *E. coli*
117	1.125 B8 2	0	0	0	
118	1.125 B8 3	0	0	0	
119	1.125 B8 4	0	0	0	
120	1.125 B8 5	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.25 B1 1	0	0	88	
122	2.25 B1 2	0	0	41	Inoculación no
123	2.25 B1 3	0	0	0	efectiva de *E.*
124	2.25 B1 4	0	0	10	*coli*
125	2.25 B1 5	0	0	0	
126	**2.25 B2 1**	**>300**	**>300**	**4548289**	
127	**2.25 B2 2**	**>300**	**>300**	**4728753**	**Inoculación**
128	**2.25 B2 3**	**>300**	**>300**	**4783460**	**efectiva de *E.***
129	**2.25 B2 4**	**>300**	**>300**	**4745054**	***coli***
130	**2.25 B2 5**	**>300**	**>300**	**4740320**	
131	**2.25 B3 1**	**>300**	**>300**	**375539**	
132	**2.25 B3 2**	**>300**	**>300**	**356456**	**Inoculación**
133	**2.25 B3 3**	**>300**	**>300**	**371785**	**efectiva de *E.***
134	**2.25 B3 4**	**>300**	**>300**	**360562**	***coli***
135	**2.25 B3 5**	**>300**	**>300**	**425472**	
136	**2.25 B4 1**	**>300**	**>300**	**4650814**	
137	**2.25 B4 2**	**>300**	**>300**	**4746977**	**Inoculación**
138	**2.25 B4 3**	**>300**	**>300**	**4744792**	**efectiva de *E.***
139	**2.25 B4 4**	**>300**	**>300**	**4757016**	***coli***
140	**2.25 B4 5**	**>300**	**>300**	**4750666**	
141	2.25 B5 1	0	0	183	
142	2.25 B5 2	0	0	10	Inoculación no
143	2.25 B5 3	0	0	49	efectiva de *E.*
144	2.25 B5 4	0	0	0	*coli*
145	2.25 B5 5	0	0	79	
146	**2.25 B6 1**	**>300**	**>300**	**4744723**	
147	**2.25 B6 2**	**>300**	**>300**	**4771607**	**Inoculación**
148	**2.25 B6 3**	**>300**	**>300**	**4333340**	**efectiva de *E.***
149	**2.25 B6 4**	**>300**	**>300**	**4463148**	***coli***
150	**2.25 B6 5**	**>300**	**>300**	**4411494**	
151	**2.25 B7 1**	**>300**	**>300**	**4202972**	
152	**2.25 B7 2**	**>300**	**>300**	**4247860**	**Inoculación**
153	**2.25 B7 3**	**>300**	**>300**	**4363081**	**efectiva de *E.***
154	**2.25 B7 4**	**>300**	**>300**	**4202759**	***coli***
155	**2.25 B7 5**	**>300**	**>300**	**4136227**	
156	**2.25 B8 1**	**>300**	**>300**	**3991194**	
157	**2.25 B8 2**	**>300**	**>300**	**4112360**	**Inoculación**
158	**2.25 B8 3**	**>300**	**>300**	**4140875**	**efectiva de *E.***
159	**2.25 B8 4**	**>300**	**>300**	**4393759**	***coli***
160	**2.25 B8 5**	**>300**	**>300**	**4393019**	
161	**4.5 B1 1**	**>300**	**>300**	**4382490**	**Inoculación**

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
162	4.5 B1 2	>300	>300	4481316	efectiva de *E. coli*
163	4.5 B1 3	>300	>300	4413224	
164	4.5 B1 4	>300	>300	4502424	
165	4.5 B1 5	>300	>300	4539440	
166	4.5 B2 1	>300	>300	4475532	Inoculación efectiva de *E. coli*
167	4.5 B2 2	>300	>300	4451361	
168	4.5 B2 3	>300	>300	4514806	
169	4.5 B2 4	>300	>300	4422836	
170	4.5 B2 5	>300	>300	4488461	
171	4.5 B3 1	>300	>300	4211343	Inoculación efectiva de *E. coli*
172	4.5 B3 2	>300	>300	4347463	
173	4.5 B3 3	>300	>300	4516838	
174	4.5 B3 4	>300	>300	4450104	
175	4.5 B3 5	>300	>300	4573429	
176	4.5 B4 1	>300	>300	4499043	Inoculación efectiva de *E. coli*
177	4.5 B4 2	>300	>300	4603136	
178	4.5 B4 3	>300	>300	4639533	
179	4.5 B4 4	>300	>300	4627461	
180	4.5 B4 5	>300	>300	4611699	
181	4.5 B5 1	>300	>300	4585905	Inoculación efectiva de *E. coli*
182	4.5 B5 2	>300	>300	4553866	
183	4.5 B5 3	>300	>300	4564371	
184	4.5 B5 4	>300	>300	4610859	
185	4.5 B5 5	>300	>300	4701484	
186	4.5 B6 1	>300	>300	4522621	Inoculación efectiva de *E. coli*
187	4.5 B6 2	>300	>300	4683168	
188	4.5 B6 3	>300	>300	4572702	
189	4.5 B6 4	>300	>300	4613659	
190	4.5 B6 5	>300	>300	4478431	
191	4.5 B7 1	>300	>300	4366611	Inoculación efectiva de *E. coli*
192	4.5 B7 2	>300	>300	1417180	
193	4.5 B7 3	>300	>300	391858	
194	4.5 B7 4	>300	>300	2972075	
195	4.5 B7 5	>300	>300	1199830	
196	4.5 B8 1	>300	>300	1214393	Inoculación efectiva de *E. coli*
197	4.5 B8 2	>300	>300	1335497	
198	4.5 B8 3	>300	>300	1089352	
199	4.5 B8 4	>300	>300	1124560	
200	4.5 B8 5	>300	>300	1276654	

Tabla VII.5.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en Dnn.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.28125 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
2	0.28125 B1 2	0	0	0	
3	0.28125 B1 3	0	0	10	
4	0.28125 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
5	0.28125 B2 2	0	0	0	
6	0.28125 B2 3	0	0	0	
7	0.28125 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
8	0.28125 B3 2	0	0	0	
9	0.28125 B3 3	0	0	0	
10	0.28125 B4 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
11	0.28125 B4 2	0	0	0	
12	0.28125 B4 3	0	0	0	
13	**0.28125 B5 1**	**>300**	**>300**	**4190192**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
14	**0.28125 B5 2**	**>300**	**>300**	**4393649**	
15	**0.28125 B5 3**	**>300**	**>300**	**4355053**	
16	**0.28125 B6 1**	**>300**	**>300**	**4274461**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
17	**0.28125 B6 2**	**>300**	**>300**	**4434189**	
18	**0.28125 B6 3**	**>300**	**>300**	**4422446**	
19	**0.28125 B7 1**	**>300**	**>300**	**4342279**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
20	**0.28125 B7 2**	**>300**	**>300**	**4608594**	
21	**0.28125 B7 3**	**>300**	**>300**	**4489701**	
22	**0.28125 B8 1**	**>300**	**>300**	**4312948**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
23	**0.28125 B8 2**	**>300**	**>300**	**4534436**	
24	**0.28125 B8 3**	**>300**	**>300**	**4609121**	
25	**0.5625 B1 1**	**54**	**54**	**354**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
26	**0.5625 B1 2**	**54**	**54**	**91**	
27	**0.5625 B1 3**	**54**	**54**	**71**	
28	**0.5625 B2 1**	**>300**	**>300**	**4405053**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
29	**0.5625 B2 2**	**>300**	**>300**	**4579257**	
30	**0.5625 B2 3**	**>300**	**>300**	**4612089**	
31	**0.5625 B3 1**	**>300**	**>300**	**4502917**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
32	**0.5625 B3 2**	**>300**	**>300**	**4550863**	
33	**0.5625 B3 3**	**>300**	**>300**	**4664951**	
34	0.5625 B4 1	0	0	142	Inoculación no efectiva de *E. coli*
35	0.5625 B4 2	0	0	0	
36	0.5625 B4 3	0	0	0	
37	**0.5625 B5 1**	**>300**	**>300**	**4574001**	**Inoculación efectiva de *E.***
38	**0.5625 B5 2**	**>300**	**>300**	**4677080**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	**0.5625 B5 3**	**>300**	**>300**	**4712733**	***coli***
40	0.5625 B6 1	0	0	81	Inoculación no
41	0.5625 B6 2	0	0	30	efectiva de *E.*
42	0.5625 B6 3	0	0	10	*coli*
43	**0.5625 B7 1**	**>300**	**>300**	**4471957**	**Inoculación**
44	**0.5625 B7 2**	**>300**	**>300**	**4494832**	**efectiva de *E.***
45	**0.5625 B7 3**	**>300**	**>300**	**4558284**	***coli***
46	**0.5625 B8 1**	**116**	**116**	**527**	**Inoculación**
47	**0.5625 B8 2**	**116**	**116**	**10**	**efectiva de *E.***
48	**0.5625 B8 3**	**116**	**116**	**61**	***coli***
49	**1.125 B1 1**	**>300**	**>300**	**4582863**	**Inoculación**
50	**1.125 B1 2**	**>300**	**>300**	**4633739**	**efectiva de *E.***
51	**1.125 B1 3**	**>300**	**>300**	**4667401**	***coli***
52	**1.125 B2 1**	**>300**	**>300**	**4489922**	**Inoculación**
53	**1.125 B2 2**	**>300**	**>300**	**4638331**	**efectiva de *E.***
54	**1.125 B2 3**	**>300**	**>300**	**4616881**	***coli***
55	**1.125 B3 1**	**>300**	**>300**	**4644806**	**Inoculación**
56	**1.125 B3 2**	**>300**	**>300**	**4359545**	**efectiva de *E.***
57	**1.125 B3 3**	**>300**	**>300**	**4614196**	***coli***
58	**1.125 B4 1**	**>300**	**>300**	**4553643**	**Inoculación**
59	**1.125 B4 2**	**>300**	**>300**	**4572438**	**efectiva de *E.***
60	**1.125 B4 3**	**>300**	**>300**	**4615295**	***coli***
61	**1.125 B5 1**	**>300**	**>300**	**4546155**	**Inoculación**
62	**1.125 B5 2**	**>300**	**>300**	**4657819**	**efectiva de *E.***
63	**1.125 B5 3**	**>300**	**>300**	**4559851**	***coli***
64	**1.125 B6 1**	**>300**	**>300**	**4564399**	**Inoculación**
65	**1.125 B6 2**	**>300**	**>300**	**4535470**	**efectiva de *E.***
66	**1.125 B6 3**	**>300**	**>300**	**4691653**	***coli***
67	**1.125 B7 1**	**>300**	**>300**	**4387996**	**Inoculación**
68	**1.125 B7 2**	**>300**	**>300**	**4556957**	**efectiva de *E.***
69	**1.125 B7 3**	**>300**	**>300**	**4612264**	***coli***
70	**1.125 B8 1**	**>300**	**>300**	**4707113**	**Inoculación**
71	**1.125 B8 2**	**>300**	**>300**	**4577643**	**efectiva de *E.***
72	**1.125 B8 3**	**>300**	**>300**	**4541889**	***coli***
73	**2.25 B1 1**	**>300**	**>300**	**4719216**	**Inoculación**
74	**2.25 B1 2**	**>300**	**>300**	**4612304**	**efectiva de *E.***
75	**2.25 B1 3**	**>300**	**>300**	**4699138**	***coli***
76	2.25 B2 1	0	0	325	Inoculación no
77	2.25 B2 2	0	0	20	efectiva de *E.*
78	2.25 B2 3	0	0	0	*coli*
79	**2.25 B3 1**	**>300**	**>300**	**4651461**	**Inoculación**

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	2.25 B3 2	>300	>300	4691402	efectiva de *E.*
81	2.25 B3 3	>300	>300	4679555	*coli*
82	2.25 B4 1	>300	>300	4650239	Inoculación
83	2.25 B4 2	>300	>300	4726124	efectiva de *E.*
84	2.25 B4 3	>300	>300	4810928	*coli*
85	2.25 B5 1	>300	>300	4765788	Inoculación
86	2.25 B5 2	>300	>300	4735644	efectiva de *E.*
87	2.25 B5 3	>300	>300	4727135	*coli*
88	2.25 B6 1	>300	>300	4760478	Inoculación
89	2.25 B6 2	>300	>300	4766138	efectiva de *E.*
90	2.25 B6 3	>300	>300	4743717	*coli*
91	2.25 B7 1	>300	>300	4584090	Inoculación
92	2.25 B7 2	>300	>300	4604244	efectiva de *E.*
93	2.25 B7 3	>300	>300	4735059	*coli*
94	2.25 B8 1	>300	>300	4719214	Inoculación
95	2.25 B8 2	>300	>300	4631356	efectiva de *E.*
96	2.25 B8 3	>300	>300	4584371	*coli*
97	4.5 B1 1	>300	>300	4717008	Inoculación
98	4.5 B1 2	>300	>300	4853876	efectiva de *E.*
99	4.5 B1 3	>300	>300	4771215	*coli*
100	4.5 B2 1	>300	>300	4683077	Inoculación
101	4.5 B2 2	>300	>300	4740261	efectiva de *E.*
102	4.5 B2 3	>300	>300	4706044	*coli*
103	4.5 B3 1	>300	>300	4716529	Inoculación
104	4.5 B3 2	>300	>300	4773523	efectiva de *E.*
105	4.5 B3 3	>300	>300	4780041	*coli*
106	4.5 B4 1	>300	>300	4617967	Inoculación
107	4.5 B4 2	>300	>300	4670777	efectiva de *E.*
108	4.5 B4 3	>300	>300	4658815	*coli*
109	4.5 B5 1	>300	>300	4812584	Inoculación
110	4.5 B5 2	>300	>300	4899601	efectiva de *E.*
111	4.5 B5 3	>300	>300	4810032	*coli*
112	4.5 B6 1	>300	>300	4522798	Inoculación
113	4.5 B6 2	>300	>300	4513588	efectiva de *E.*
114	4.5 B6 3	>300	>300	4517786	*coli*
115	4.5 B7 1	>300	>300	4614420	Inoculación
116	4.5 B7 2	>300	>300	4677850	efectiva de *E.*
117	4.5 B7 3	>300	>300	4679120	*coli*
118	4.5 B8 1	>300	>300	4438126	Inoculación
119	4.5 B8 2	>300	>300	4445896	efectiva de *E.*
120	4.5 B8 3	>300	>300	4495036	*coli*

Tabla VII.5.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en Ger.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.281 B1 1	0	0	0	
2	0.281 B1 2	0	0	0	Inoculación no
3	0.281 B1 3	0	0	0	efectiva de *E.*
4	0.281 B1 4	0	0	0	*coli*
5	0.281 B1 5	0	0	0	
6	0.281 B2 1	0	0	0	
7	0.281 B2 2	0	0	0	Inoculación no
8	0.281 B2 3	0	0	0	efectiva de *E.*
9	0.281 B2 4	0	0	0	*coli*
10	0.281 B2 5	0	0	0	
11	0.281 B3 1	0	0	0	
12	0.281 B3 2	0	0	10	Inoculación no
13	0.281 B3 3	0	0	0	efectiva de *E.*
14	0.281 B3 4	0	0	0	*coli*
15	0.281 B3 5	0	0	0	
16	0.281 B4 1	0	0	10	
17	0.281 B4 2	0	0	10	Inoculación no
18	0.281 B4 3	0	0	10	efectiva de *E.*
19	0.281 B4 4	0	0	91	*coli*
20	0.281 B4 5	0	0	10	
21	0.281 B5 1	0	0	0	
22	0.281 B5 2	0	0	0	Inoculación no
23	0.281 B5 3	0	0	0	efectiva de *E.*
24	0.281 B5 4	0	0	10	*coli*
25	0.281 B5 5	0	0	0	
26	0.281 B6 1	0	0	0	
27	0.281 B6 2	0	0	0	Inoculación no
28	0.281 B6 3	0	0	0	efectiva de *E.*
29	0.281 B6 4	0	0	29	*coli*
30	0.281 B6 5	0	0	0	
31	0.281 B7 1	0	0	20	
32	0.281 B7 2	0	0	0	Inoculación no
33	0.281 B7 3	0	0	10	efectiva de *E.*
34	0.281 B7 4	0	0	0	*coli*
35	0.281 B7 5	0	0	30	
36	0.281 B8 1	0	0	10	Inoculación no
37	0.281 B8 2	0	0	0	efectiva de *E.*
38	0.281 B8 3	0	0	10	*coli*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.281 B8 4	0	0	10	
40	0.281 B8 5	0	0	41	
41	0.5625 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
42	0.5625 B1 2	0	0	20	
43	0.5625 B1 3	0	0	0	
44	0.5625 B1 4	0	0	0	
45	0.5625 B1 5	0	0	0	
46	0.5625 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
47	0.5625 B2 2	0	0	0	
48	0.5625 B2 3	0	0	0	
49	0.5625 B2 4	0	0	0	
50	0.5625 B2 5	0	0	0	
51	0.5625 B3 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *E. coli*
52	0.5625 B3 2	0	0	0	
53	0.5625 B3 3	0	0	0	
54	0.5625 B3 4	0	0	20	
55	0.5625 B3 5	0	0	128	
56	0.5625 B4 1	0	0	51	Inoculación no efectiva de *E. coli*
57	0.5625 B4 2	0	0	20	
58	0.5625 B4 3	0	0	0	
59	0.5625 B4 4	0	0	0	
60	0.5625 B4 5	0	0	0	
61	0.5625 B5 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
62	0.5625 B5 2	0	0	0	
63	0.5625 B5 3	0	0	10	
64	0.5625 B5 4	0	0	0	
65	0.5625 B5 5	0	0	0	
66	0.5625 B6 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *E. coli*
67	0.5625 B6 2	0	0	0	
68	0.5625 B6 3	0	0	10	
69	0.5625 B6 4	0	0	0	
70	0.5625 B6 5	0	0	0	
71	0.5625 B7 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
72	0.5625 B7 2	0	0	10	
73	0.5625 B7 3	0	0	10	
74	0.5625 B7 4	0	0	0	
75	0.5625 B7 5	0	0	0	
76	0.5625 B8 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
77	0.5625 B8 2	0	0	0	
78	0.5625 B8 3	0	0	0	
79	0.5625 B8 4	0	0	10	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	0.5625 B8 5	0	0	0	
81	1.125 B1 1	0	0	20	
82	1.125 B1 2	0	0	0	Inoculación no
83	1.125 B1 3	0	0	10	efectiva de *E.*
84	1.125 B1 4	0	0	0	*coli*
85	1.125 B1 5	0	0	0	
86	1.125 B2 1	0	0	20	
87	1.125 B2 2	0	0	0	Inoculación no
88	1.125 B2 3	0	0	0	efectiva de *E.*
89	1.125 B2 4	0	0	0	*coli*
90	1.125 B2 5	0	0	0	
91	1.125 B3 1	0	0	0	
92	1.125 B3 2	0	0	0	Inoculación no
93	1.125 B3 3	0	0	30	efectiva de *E.*
94	1.125 B3 4	0	0	29	*coli*
95	1.125 B3 5	0	0	0	
96	1.125 B4 1	0	0	0	
97	1.125 B4 2	0	0	10	Inoculación no
98	1.125 B4 3	0	0	61	efectiva de *E.*
99	1.125 B4 4	0	0	0	*coli*
100	1.125 B4 5	0	0	0	
101	1.125 B5 1	0	0	10	
102	1.125 B5 2	0	0	0	Inoculación no
103	1.125 B5 3	0	0	0	efectiva de *E.*
104	1.125 B5 4	0	0	0	*coli*
105	1.125 B5 5	0	0	0	
106	1.125 B6 1	0	0	10	
107	1.125 B6 2	0	0	0	Inoculación no
108	1.125 B6 3	0	0	10	efectiva de *E.*
109	1.125 B6 4	0	0	0	*coli*
110	1.125 B6 5	0	0	0	
111	1.125 B7 1	0	0	0	
112	1.125 B7 2	0	0	0	Inoculación no
113	1.125 B7 3	0	0	0	efectiva de *E.*
114	1.125 B7 4	0	0	0	*coli*
115	1.125 B7 5	0	0	0	
116	1.125 B8 1	0	0	0	
117	1.125 B8 2	0	0	0	Inoculación no
118	1.125 B8 3	0	0	10	efectiva de *E.*
119	1.125 B8 4	0	0	10	*coli*
120	1.125 B8 5	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.25 B1 1	0	0	0	
122	2.25 B1 2	0	0	20	Inoculación no
123	2.25 B1 3	0	0	0	efectiva de *E.*
124	2.25 B1 4	0	0	0	*coli*
125	2.25 B1 5	0	0	0	
126	2.25 B2 1	0	0	20	
127	2.25 B2 2	0	0	0	Inoculación no
128	2.25 B2 3	0	0	10	efectiva de *E.*
129	2.25 B2 4	0	0	0	*coli*
130	2.25 B2 5	0	0	0	
131	2.25 B3 1	0	0	0	
132	2.25 B3 2	0	0	0	Inoculación no
133	2.25 B3 3	0	0	20	efectiva de *E.*
134	2.25 B3 4	0	0	10	*coli*
135	2.25 B3 5	0	0	0	
136	2.25 B4 1	0	0	0	
137	2.25 B4 2	0	0	0	Inoculación no
138	2.25 B4 3	0	0	20	efectiva de *E.*
139	2.25 B4 4	0	0	20	*coli*
140	2.25 B4 5	0	0	0	
141	2.25 B5 1	0	0	10	
142	2.25 B5 2	0	0	10	Inoculación no
143	2.25 B5 3	0	0	10	efectiva de *E.*
144	2.25 B5 4	0	0	0	*coli*
145	2.25 B5 5	0	0	10	
146	2.25 B6 1	0	0	0	
147	2.25 B6 2	0	0	10	Inoculación no
148	2.25 B6 3	0	0	0	efectiva de *E.*
149	2.25 B6 4	0	0	30	*coli*
150	2.25 B6 5	0	0	10	
151	2.25 B7 1	0	0	0	
152	2.25 B7 2	0	0	10	Inoculación no
153	2.25 B7 3	0	0	10	efectiva de *E.*
154	2.25 B7 4	0	0	0	*coli*
155	2.25 B7 5	0	0	20	
156	2.25 B8 1	0	0	112	
157	2.25 B8 2	0	0	20	Inoculación no
158	2.25 B8 3	0	0	20	efectiva de *E.*
159	2.25 B8 4	0	0	29	*coli*
160	2.25 B8 5	0	0	39	
161	4.5 B1 1	0	0	0	Inoculación no

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
162	4.5 B1 2	0	0	20	efectiva de *E. coli*
163	4.5 B1 3	0	0	10	
164	4.5 B1 4	0	0	10	
165	4.5 B1 5	0	0	20	
166	4.5 B2 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *E. coli*
167	4.5 B2 2	0	0	10	
168	4.5 B2 3	0	0	10	
169	4.5 B2 4	0	0	0	
170	4.5 B2 5	0	0	20	
171	4.5 B3 1	0	0	41	Inoculación no efectiva de *E. coli*
172	4.5 B3 2	0	0	30	
173	4.5 B3 3	0	0	10	
174	4.5 B3 4	0	0	10	
175	4.5 B3 5	0	0	20	
176	4.5 B4 1	0	0	142	Inoculación no efectiva de *E. coli*
177	4.5 B4 2	0	0	20	
178	4.5 B4 3	0	0	61	
179	4.5 B4 4	0	0	20	
180	4.5 B4 5	0	0	10	
181	4.5 B5 1	0	0	49	Inoculación no efectiva de *E. coli*
182	4.5 B5 2	0	0	30	
183	4.5 B5 3	0	0	0	
184	4.5 B5 4	0	0	20	
185	4.5 B5 5	0	0	0	
186	4.5 B6 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
187	4.5 B6 2	0	0	0	
188	4.5 B6 3	0	0	0	
189	4.5 B6 4	0	0	10	
190	4.5 B6 5	0	0	0	
191	4.5 B7 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *E. coli*
192	4.5 B7 2	0	0	10	
193	4.5 B7 3	0	0	20	
194	4.5 B7 4	0	0	0	
195	4.5 B7 5	0	0	0	
196	4.5 B8 1	0	0	29	Inoculación no efectiva de *E. coli*
197	4.5 B8 2	0	0	0	
198	4.5 B8 3	0	0	10	
199	4.5 B8 4	0	0	20	
200	4.5 B8 5	0	0	0	

Tabla VII.5.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Escherichia coli* en gel Nel.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.28125 B1 1	0	0	20	Inoculación no efectiva de *E. coli*
2	0.28125 B1 2	0	0	20	
3	0.28125 B1 3	0	0	20	
4	0.28125 B2 1	0	0	30	Inoculación no efectiva de *E. coli*
5	0.28125 B2 2	0	0	1235	
6	0.28125 B2 3	0	0	30	
7	0.28125 B3 1	0	0	496	Inoculación no efectiva de *E. coli*
8	0.28125 B3 2	0	0	20	
9	0.28125 B3 3	0	0	10	
10	0.28125 B4 1	0	0	61	Inoculación no efectiva de *E. coli*
11	0.28125 B4 2	0	0	81	
12	0.28125 B4 3	0	0	71	
13	0.28125 B5 1	0	0	30	Inoculación no efectiva de *E. coli*
14	0.28125 B5 2	0	0	10	
15	0.28125 B5 3	0	0	41	
16	0.28125 B6 1	0	24	132	Inoculación no efectiva de *E. coli*. Otros
17	0.28125 B6 2	0	24	2035	
18	0.28125 B6 3	0	24	30	
19	**0.28125 B7 1**	**>300**	**>300**	**4834469**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
20	**0.28125 B7 2**	**>300**	**>300**	**4900349**	
21	**0.28125 B7 3**	**>300**	**>300**	**4898583**	
22	**0.28125 B8 1**	**>300**	**>300**	**4822972**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
23	**0.28125 B8 2**	**>300**	**>300**	**4873516**	
24	**0.28125 B8 3**	**>300**	**>300**	**4926311**	
25	0.5625 B1 1	0	>300	12801	Inoculación no efectiva de *E. coli*. Otros
26	0.5625 B1 2	0	>300	8988	
27	0.5625 B1 3	0	>300	8200	
28	**0.5625 B2 1**	**>300**	**>300**	**4846394**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
29	**0.5625 B2 2**	**>300**	**>300**	**4902467**	
30	**0.5625 B2 3**	**>300**	**>300**	**4941396**	
31	**0.5625 B3 1**	**>300**	**>300**	**4919204**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
32	**0.5625 B3 2**	**>300**	**>300**	**4951985**	
33	**0.5625 B3 3**	**>300**	**>300**	**4910787**	
34	**0.5625 B4 1**	**>300**	**>300**	**4835049**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
35	**0.5625 B4 2**	**>300**	**>300**	**4924605**	
36	**0.5625 B4 3**	**>300**	**>300**	**4881761**	
37	**0.5625 B5 1**	**>300**	**>300**	**4832677**	**Inoculación efectiva de *E.***
38	**0.5625 B5 2**	**>300**	**>300**	**4923247**	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	**0.5625 B5 3**	**>300**	**>300**	**4916590**	***coli***
40	**0.5625 B6 1**	**>300**	**>300**	**4913291**	**Inoculación**
41	**0.5625 B6 2**	**>300**	**>300**	**4925576**	**efectiva de *E.***
42	**0.5625 B6 3**	**>300**	**>300**	**4894897**	***coli***
43	**0.5625 B7 1**	**>300**	**>300**	**4918654**	**Inoculación**
44	**0.5625 B7 2**	**>300**	**>300**	**4929364**	**efectiva de *E.***
45	**0.5625 B7 3**	**>300**	**>300**	**4941662**	***coli***
46	**0.5625 B8 1**	**>300**	**>300**	**4906846**	**Inoculación**
47	**0.5625 B8 2**	**>300**	**>300**	**4919210**	**efectiva de *E.***
48	**0.5625 B8 3**	**>300**	**>300**	**4904661**	***coli***
49	**1.125 B1 1**	**>300**	**>300**	**4874103**	**Inoculación**
50	**1.125 B1 2**	**>300**	**>300**	**4895241**	**efectiva de *E.***
51	**1.125 B1 3**	**>300**	**>300**	**4930752**	***coli***
52	**1.125 B2 1**	**>300**	**>300**	**4888204**	**Inoculación**
53	**1.125 B2 2**	**>300**	**>300**	**4919272**	**efectiva de *E.***
54	**1.125 B2 3**	**>300**	**>300**	**4918423**	***coli***
55	**1.125 B3 1**	**>300**	**>300**	**4900291**	**Inoculación**
56	**1.125 B3 2**	**>300**	**>300**	**4916156**	**efectiva de *E.***
57	**1.125 B3 3**	**>300**	**>300**	**4915225**	***coli***
58	1.125 B4 1	0	0	193	Inoculación no
59	1.125 B4 2	0	0	132	efectiva de *E.*
60	1.125 B4 3	0	0	30	*coli*
61	**1.125 B5 1**	**>300**	**>300**	**14931**	**Inoculación**
62	**1.125 B5 2**	**>300**	**>300**	**13384**	**efectiva de *E.***
63	**1.125 B5 3**	**>300**	**>300**	**21017**	***coli***
64	1.125 B6 1	0	0	0	Inoculación no
65	1.125 B6 2	0	0	10	efectiva de *E.*
66	1.125 B6 3	0	0	0	*coli*
67	1.125 B7 1	0	0	0	Inoculación no
68	1.125 B7 2	0	0	0	efectiva de *E.*
69	1.125 B7 3	0	0	20	*coli*
70	**1.125 B8 1**	**>300**	**>300**	**55876**	**Inoculación**
71	**1.125 B8 2**	**>300**	**>300**	**35935**	**efectiva de *E.***
72	**1.125 B8 3**	**>300**	**>300**	**58923**	***coli***
73	**2.25 B1 1**	**>300**	**>300**	**4767193**	**Inoculación**
74	**2.25 B1 2**	**>300**	**>300**	**4809296**	**efectiva de *E.***
75	**2.25 B1 3**	**>300**	**>300**	**4843075**	***coli***
76	2.25 B2 1	0	0	396	Inoculación no
77	2.25 B2 2	0	0	41	efectiva de *E.*
78	2.25 B2 3	0	0	10	*coli*
79	**2.25 B3 1**	**>300**	**>300**	**4820695**	**Inoculación**

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	**2.25 B3 2**	**>300**	**>300**	**4901612**	**efectiva de *E. coli***
81	**2.25 B3 3**	**>300**	**>300**	**4862138**	
82	2.25 B4 1	0	0	304	Inoculación no efectiva de *E. coli*
83	2.25 B4 2	0	0	203	
84	2.25 B4 3	0	0	10	
85	**2.25 B5 1**	**>300**	**>300**	**4960003**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
86	**2.25 B5 2**	**>300**	**>300**	**4644012**	
87	**2.25 B5 3**	**>300**	**>300**	**4763416**	
88	**2.25 B6 1**	**>300**	**>300**	**4652068**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
89	**2.25 B6 2**	**>300**	**>300**	**4627809**	
90	**2.25 B6 3**	**>300**	**>300**	**4643302**	
91	**2.25 B7 1**	**>300**	**>300**	**4578148**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
92	**2.25 B7 2**	**>300**	**>300**	**4717998**	
93	**2.25 B7 3**	**>300**	**>300**	**4672640**	
94	**2.25 B8 1**	**>300**	**>300**	**4639760**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
95	**2.25 B8 2**	**>300**	**>300**	**4622710**	
96	**2.25 B8 3**	**>300**	**>300**	**4613339**	
97	**4.5 B1 1**	**>300**	**>300**	**4610418**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
98	**4.5 B1 2**	**>300**	**>300**	**4600299**	
99	**4.5 B1 3**	**>300**	**>300**	**4700207**	
100	**4.5 B2 1**	**>300**	**>300**	**4639683**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
101	**4.5 B2 2**	**>300**	**>300**	**4655759**	
102	**4.5 B2 3**	**>300**	**>300**	**4792073**	
103	**4.5 B3 1**	**>300**	**>300**	**4734936**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
104	**4.5 B3 2**	**>300**	**>300**	**4710786**	
105	**4.5 B3 3**	**>300**	**>300**	**4714106**	
106	**4.5 B4 1**	**>300**	**>300**	**4666006**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
107	**4.5 B4 2**	**>300**	**>300**	**4700636**	
108	**4.5 B4 3**	**>300**	**>300**	**4723377**	
109	**4.5 B5 1**	**>300**	**>300**	**4611974**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
110	**4.5 B5 2**	**>300**	**>300**	**4520008**	
111	**4.5 B5 3**	**>300**	**>300**	**4656215**	
112	**4.5 B6 1**	**>300**	**>300**	**4738732**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
113	**4.5 B6 2**	**>300**	**>300**	**4747800**	
114	**4.5 B6 3**	**>300**	**>300**	**4665659**	
115	**4.5 B7 1**	**>300**	**>300**	**4684969**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
116	**4.5 B7 2**	**>300**	**>300**	**4649363**	
117	**4.5 B7 3**	**>300**	**>300**	**4628082**	
118	**4.5 B8 1**	**>300**	**>300**	**4643716**	**Inoculación efectiva de *E. coli***
119	**4.5 B8 2**	**>300**	**>300**	**4648539**	
120	**4.5 B8 3**	**>300**	**>300**	**4542261**	

VII.6. Estudios correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* en muestras de geles

Leyenda:

- [a, b] **Nomenclatura para la numeración y denominación de muestras:** Las muestras son numeradas arábigamente con arreglo a la posición para el análisis **(columna número)**[a]. La denominación de las muestras se corresponde con la concentración teórica inoculada de microorganismo/número de frasco/número de vial **(columna muestra)**[b] **(Ejemplo:** 0.265 B1 1 se corresponde con una concentración teórica inoculada de 0.265 microorganismos, del frasco número 1 y medida en el vial 1,
- [c] **Método tradicional selectivo (MTS):** resultados correspondientes a la siembra de *Candida albicans* en medio selectivo BIGGY y expresados en u.f.c./placa
- [d] **Método tradicional general (MTG):** resultados correspondientes a la siembra de *Candida albicans* en medio general TSA y expresados en u.f.c./placa
- [e] **Contaje/mL**: número de microorganismos contados por el citómetro de flujo.
- [f] **Observaciones**[6]**:** las muestras clasificadas positivas por el citómetro de flujo se indican en **negrita.**
- Los falsos resultados se marcan en rojo; y los resultados DP se marcan en verde.

Tabla VII.6.1. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Av. Kin.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.359 B1 1	200	200	29	Inoculación efectiva de *C. albicans*
2	0.359 B1 2	200	200	98	
3	0.359 B1 3	200	200	49	
4	0.359 B1 4	200	200	59	
5	0.359 B1 5	200	200	79	
6	0.359 B2 1	>300	>300	246	Inoculación efectiva de *C. albicans*
7	0.359 B2 2	>300	>300	216	
8	0.359 B2 3	>300	>300	393	
9	0.359 B2 4	>300	>300	284	
10	0.359 B2 5	>300	>300	284	
11	0.359 B3 1	>300	>300	187	Inoculación efectiva de *C. albicans*
12	0.359 B3 2	>300	>300	152	
13	0.359 B3 3	>300	>300	137	
14	0.359 B3 4	>300	>300	216	
15	0.359 B3 5	>300	>300	203	
16	0.359 B4 1	>300	>300	147	Inoculación efectiva de *C. albicans*
17	0.359 B4 2	>300	>300	177	
18	0.359 B4 3	>300	>300	157	
19	0.359 B4 4	>300	>300	49	
20	0.359 B4 5	>300	>300	108	
21	0.359 B5 1	>300	>300	254	Inoculación efectiva de *C. albicans*
22	0.359 B5 2	>300	>300	203	
23	0.359 B5 3	>300	>300	284	
24	0.359 B5 4	>300	>300	167	
25	0.359 B5 5	>300	>300	187	
26	0.359 B6 1	>300	>300	147	Inoculación efectiva de *C. albicans*
27	0.359 B6 2	>300	>300	167	
28	0.359 B6 3	>300	>300	128	
29	0.359 B6 4	>300	>300	187	
30	0.359 B6 5	>300	>300	285	
31	0.359 B7 1	>300	>300	2013	Inoculación efectiva de *C. albicans*
32	0.359 B7 2	>300	>300	2443	
33	0.359 B7 3	>300	>300	2215	
34	0.359 B7 4	>300	>300	2540	
35	0.359 B7 5	>300	>300	2678	
36	0.359 B8 1	>300	>300	393	Inoculación efectiva de *C. albicans*
37	0.359 B8 2	>300	>300	383	
38	0.359 B8 3	>300	>300	203	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.359 B8 4	>300	>300	335	
40	0.359 B8 5	>300	>300	285	
41	0.718 B1 1	>300	>300	471	
42	0.718 B1 2	>300	>300	756	Inoculación efectiva de *C. albicans*
43	0.718 B1 3	>300	>300	775	
44	0.718 B1 4	>300	>300	700	
45	0.718 B1 5	>300	>300	741	
46	0.718 B2 1	>300	>300	138	
47	0.718 B2 2	>300	>300	177	Inoculación efectiva de *C. albicans*
48	0.718 B2 3	>300	>300	98	
49	0.718 B2 4	>300	>300	216	
50	0.718 B2 5	>300	>300	142	
51	0.718 B3 1	>300	>300	187	
52	0.718 B3 2	>300	>300	275	Inoculación efectiva de *C. albicans*
53	0.718 B3 3	>300	>300	304	
54	0.718 B3 4	>300	>300	118	
55	0.718 B3 5	>300	>300	177	
56	0.718 B4 1	>300	>300	216	
57	0.718 B4 2	>300	>300	163	Inoculación efectiva de *C. albicans*
58	0.718 B4 3	>300	>300	81	
59	0.718 B4 4	>300	>300	152	
60	0.718 B4 5	>300	>300	193	
61	0.718 B5 1	>300	>300	122	
62	0.718 B5 2	>300	>300	223	Inoculación efectiva de *C. albicans*
63	0.718 B5 3	>300	>300	196	
64	0.718 B5 4	>300	>300	177	
65	0.718 B5 5	>300	>300	315	
66	0.718 B6 1	>300	>300	2014	
67	0.718 B6 2	>300	>300	2225	Inoculación efectiva de *C. albicans*
68	0.718 B6 3	>300	>300	1738	
69	0.718 B6 4	>300	>300	2050	
70	0.718 B6 5	>300	>300	2444	
71	0.718 B7 1	>300	>300	1279	
72	0.718 B7 2	>300	>300	1307	Inoculación efectiva de *C. albicans*
73	0.718 B7 3	>300	>300	1621	
74	0.718 B7 4	>300	>300	1816	
75	0.718 B7 5	>300	>300	1680	
76	0.718 B8 1	>300	>300	39	Inoculación efectiva de *C. albicans*
77	0.718 B8 2	>300	>300	30	
78	0.718 B8 3	>300	>300	49	
79	0.718 B8 4	>300	>300	59	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	0.718 B8 5	>300	>300	0	
81	1.4375 B1 1	>300	>300	6828	
82	1.4375 B1 2	>300	>300	6918	Inoculación
83	1.4375 B1 3	>300	>300	7304	efectiva de *C.*
84	1.4375 B1 4	>300	>300	7277	*albicans*
85	1.4375 B1 5	>300	>300	7158	
86	1.4375 B2 1	>300	>300	3115	
87	1.4375 B2 2	>300	>300	3052	Inoculación
88	1.4375 B2 3	>300	>300	3228	efectiva de *C.*
89	1.4375 B2 4	>300	>300	2876	*albicans*
90	1.4375 B2 5	>300	>300	3654	
91	1.4375 B3 1	>300	>300	4388	
92	1.4375 B3 2	>300	>300	4533	Inoculación
93	1.4375 B3 3	>300	>300	4874	efectiva de *C.*
94	1.4375 B3 4	>300	>300	4216	*albicans*
95	1.4375 B3 5	>300	>300	4611	
96	1.4375 B4 1	>300	>300	569	
97	1.4375 B4 2	>300	>300	579	Inoculación
98	1.4375 B4 3	>300	>300	628	efectiva de *C.*
99	1.4375 B4 4	>300	>300	589	*albicans*
100	1.4375 B4 5	>300	>300	677	
101	1.4375 B5 1	>300	>300	1031	
102	1.4375 B5 2	>300	>300	932	Inoculación
103	1.4375 B5 3	>300	>300	914	efectiva de *C.*
104	1.4375 B5 4	>300	>300	1080	*albicans*
105	1.4375 B5 5	>300	>300	893	
106	1.4375 B6 1	>300	>300	481	
107	1.4375 B6 2	>300	>300	354	Inoculación
108	1.4375 B6 3	>300	>300	353	efectiva de *C.*
109	1.4375 B6 4	>300	>300	550	*albicans*
110	1.4375 B6 5	>300	>300	528	
111	1.4375 B7 1	>300	>300	22101	
112	1.4375 B7 2	>300	>300	14059	Inoculación
113	1.4375 B7 3	>300	>300	21149	efectiva de *C.*
114	1.4375 B7 4	>300	>300	15127	*albicans*
115	1.4375 B7 5	>300	>300	20879	
116	1.4375 B8 1	>300	>300	2091	
117	1.4375 B8 2	>300	>300	2072	Inoculación
118	1.4375 B8 3	>300	>300	1512	efectiva de *C.*
119	1.4375 B8 4	>300	>300	1869	*albicans*
120	1.4375 B8 5	>300	>300	1989	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.875 B1 1	>300	>300	4902	Inoculación efectiva de *C. albicans*
122	2.875 B1 2	>300	>300	5228	
123	2.875 B1 3	>300	>300	4995	
124	2.875 B1 4	>300	>300	5102	
125	2.875 B1 5	>300	>300	5046	
126	2.875 B2 1	>300	>300	5922	Inoculación efectiva de *C. albicans*
127	2.875 B2 2	>300	>300	4328	
128	2.875 B2 3	>300	>300	4956	
129	2.875 B2 4	>300	>300	5092	
130	2.875 B2 5	>300	>300	4942	
131	2.875 B3 1	>300	>300	4752	Inoculación efectiva de *C. albicans*
132	2.875 B3 2	>300	>300	5449	
133	2.875 B3 3	>300	>300	5940	
134	2.875 B3 4	>300	>300	5850	
135	2.875 B3 5	>300	>300	4444	
136	2.875 B4 1	>300	>300	4002	Inoculación efectiva de *C. albicans*
137	2.875 B4 2	>300	>300	6224	
138	2.875 B4 3	>300	>300	4990	
139	2.875 B4 4	>300	>300	5957	
140	2.875 B4 5	>300	>300	5376	
141	2.875 B5 1	>300	>300	5402	Inoculación efectiva de *C. albicans*
142	2.875 B5 2	>300	>300	5018	
143	2.875 B5 3	>300	>300	5999	
144	2.875 B5 4	>300	>300	5557	
145	2.875 B5 5	>300	>300	4966	
146	2.875 B6 1	>300	>300	4325	Inoculación efectiva de *C. albicans*
147	2.875 B6 2	>300	>300	5698	
148	2.875 B6 3	>300	>300	6993	
149	2.875 B6 4	>300	>300	4782	
150	2.875 B6 5	>300	>300	5447	
151	2.875 B7 1	>300	>300	4884	Inoculación efectiva de *C. albicans*
152	2.875 B7 2	>300	>300	3958	
133	2.875 B7 3	>300	>300	4863	
154	2.875 B7 4	>300	>300	4132	
155	2.875 B7 5	>300	>300	5596	
156	2.875 B8 1	>300	>300	5802	Inoculación efectiva de *C. albicans*
157	2.875 B8 2	>300	>300	4968	
158	2.875 B8 3	>300	>300	4596	
159	2.875 B8 4	>300	>300	5196	
160	2.875 B8 5	>300	>300	4999	

Tabla VII.6.2. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Lac.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.359 B1 1	>300	>300	168	
2	0.359 B1 2	>300	>300	206	**Inoculación**
3	0.359 B1 3	>300	>300	309	**efectiva de *C.***
4	0.359 B1 4	>300	>300	296	***albicans***
5	0.359 B1 5	>300	>300	274	
6	0.359 B2 1	>300	>300	249	
7	0.359 B2 2	>300	>300	259	**Inoculación**
8	0.359 B2 3	>300	>300	296	**efectiva de *C.***
9	0.359 B2 4	>300	>300	247	***albicans***
10	0.359 B2 5	>300	>300	233	
11	0.359 B3 1	150	150	210	
12	0.359 B3 2	150	150	99	**Inoculación**
13	0.359 B3 3	150	150	44	**efectiva de *C.***
14	0.359 B3 4	150	150	38	***albicans***
15	0.359 B3 5	150	150	84	
16	0.359 B4 1	>300	>300	133	
17	0.359 B4 2	>300	>300	125	**Inoculación**
18	0.359 B4 3	>300	>300	199	**efectiva de *C.***
19	0.359 B4 4	>300	>300	142	***albicans***
20	0.359 B4 5	>300	>300	172	
21	0.359 B5 1	>300	>300	1415	
22	0.359 B5 2	>300	>300	1473	**Inoculación**
23	0.359 B5 3	>300	>300	1286	**efectiva de *C.***
24	0.359 B5 4	>300	>300	1348	***albicans***
25	0.359 B5 5	>300	>300	1488	
26	0.359 B6 1	>300	>300	258	
27	0.359 B6 2	>300	>300	236	**Inoculación**
28	0.359 B6 3	>300	>300	186	**efectiva de *C.***
29	0.359 B6 4	>300	>300	247	***albicans***
30	0.359 B6 5	>300	>300	283	
31	0.359 B7 1	>300	>300	164	
32	0.359 B7 2	>300	>300	122	**Inoculación**
33	0.359 B7 3	>300	>300	136	**efectiva de *C.***
34	0.359 B7 4	>300	>300	194	***albicans***
35	0.359 B7 5	>300	>300	193	
36	0.359 B8 1	>300	>300	243	**Inoculación**
37	0.359 B8 2	>300	>300	263	**efectiva de *C.***

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
38	0.359 B8 3	>300	>300	296	*albicans*
39	0.359 B8 4	>300	>300	245	
40	0.359 B8 5	>300	>300	285	
41	0.718 B1 1	>300	>300	1498	
42	0.718 B1 2	>300	>300	1553	Inoculación
43	0.718 B1 3	>300	>300	1372	efectiva de *C.*
44	0.718 B1 4	>300	>300	1430	*albicans*
45	0.718 B1 5	>300	>300	1547	
46	0.718 B6 1	>300	>300	1924	
47	0.718 B6 2	>300	>300	2025	Inoculación
48	0.718 B6 3	>300	>300	1856	efectiva de *C.*
49	0.718 B6 4	>300	>300	2054	*albicans*
50	0.718 B6 5	>300	>300	1934	
51	0.718 B7 1	>300	>300	1575	
52	0.718 B7 2	>300	>300	1474	Inoculación
53	0.718 B7 3	>300	>300	1601	efectiva de *C.*
54	0.718 B7 4	>300	>300	1593	*albicans*
55	0.718 B7 5	>300	>300	1600	
56	0.718 B4 1	>300	>300	195	
57	0.718 B4 2	>300	>300	168	Inoculación
58	0.718 B4 3	>300	>300	137	efectiva de *C.*
59	0.718 B4 4	>300	>300	141	*albicans*
60	0.718 B4 5	>300	>300	184	
61	0.718 B5 1	>300	>300	132	
62	0.718 B5 2	>300	>300	193	Inoculación
63	0.718 B5 3	>300	>300	199	efectiva de *C.*
64	0.718 B5 4	>300	>300	184	*albicans*
65	0.718 B5 5	>300	>300	195	
76	0.718 B8 1	>300	>300	33	
77	0.718 B8 2	>300	>300	39	Inoculación
78	0.718 B8 3	>300	>300	29	efectiva de *C.*
79	0.718 B8 4	>300	>300	60	*albicans*
80	0.718 B8 5	>300	>300	50	
81	1.4375 B1 1	>300	>300	5436	
82	1.4375 B1 2	>300	>300	5934	Inoculación
83	1.4375 B1 3	>300	>300	6606	efectiva de *C.*
84	1.4375 B1 4	>300	>300	6259	*albicans*
85	1.4375 B1 5	>300	>300	6381	
86	1.4375 B2 1	>300	>300	5817	Inoculación
87	1.4375 B2 2	>300	>300	5712	efectiva de *C.*
88	1.4375 B2 3	>300	>300	5356	*albicans*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
89	1.4375 B2 4	>300	>300	4851	
90	1.4375 B2 5	>300	>300	5471	
91	1.4375 B3 1	>300	>300	7344	
92	1.4375 B3 2	>300	>300	7569	Inoculación
93	1.4375 B3 3	>300	>300	7484	efectiva de *C.*
94	1.4375 B3 4	>300	>300	7119	*albicans*
95	1.4375 B3 5	>300	>300	7216	
96	1.4375 B4 1	>300	>300	1869	
97	1.4375 B4 2	>300	>300	1674	Inoculación
98	1.4375 B4 3	>300	>300	1722	efectiva de *C.*
99	1.4375 B4 4	>300	>300	1521	*albicans*
100	1.4375 B4 5	>300	>300	1753	
101	1.4375 B5 1	>300	>300	10611	
102	1.4375 B5 2	>300	>300	9952	Inoculación
103	1.4375 B5 3	>300	>300	9947	efectiva de *C.*
104	1.4375 B5 4	>300	>300	10089	*albicans*
105	1.4375 B5 5	>300	>300	8999	
106	1.4375 B6 1	>300	>300	2394	
107	1.4375 B6 2	>300	>300	2357	Inoculación
108	1.4375 B6 3	>300	>300	2451	efectiva de *C.*
109	1.4375 B6 4	>300	>300	2450	*albicans*
110	1.4375 B6 5	>300	>300	2463	
111	1.4375 B7 1	>300	>300	2204	
112	1.4375 B7 2	>300	>300	1964	Inoculación
113	1.4375 B7 3	>300	>300	2064	efectiva de *C.*
114	1.4375 B7 4	>300	>300	1984	*albicans*
115	1.4375 B7 5	>300	>300	2131	
116	1.4375 B8 1	>300	>300	18887	
117	1.4375 B8 2	>300	>300	18831	Inoculación
118	1.4375 B8 3	>300	>300	17373	efectiva de *C.*
119	1.4375 B8 4	>300	>300	17886	*albicans*
120	1.4375 B8 5	>300	>300	18883	
121	2.875 B1 1	>300	>300	7493	
122	2.875 B1 2	>300	>300	6858	Inoculación
123	2.875 B1 3	>300	>300	7496	efectiva de *C.*
124	2.875 B1 4	>300	>300	6113	*albicans*
125	2.875 B1 5	>300	>300	7953	
126	2.875 B2 1	>300	>300	5443	
127	2.875 B2 2	>300	>300	6776	Inoculación
128	2.875 B2 3	>300	>300	5966	efectiva de *C.*
129	2.875 B2 4	>300	>300	6536	*albicans*

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
130	2.875 B2 5	>300	>300	5843	
131	2.875 B3 1	>300	>300	5447	
132	2.875 B3 2	>300	>300	6225	Inoculación efectiva de *C. albicans*
133	2.875 B3 3	>300	>300	6312	
134	2.875 B3 4	>300	>300	5981	
135	2.875 B3 5	>300	>300	6558	
136	2.875 B4 1	>300	>300	5361	
137	2.875 B4 2	>300	>300	4996	Inoculación efectiva de *C. albicans*
138	2.875 B4 3	>300	>300	4993	
139	2.875 B4 4	>300	>300	5580	
140	2.875 B4 5	>300	>300	5498	
141	2.875 B5 1	>300	>300	6573	
142	2.875 B5 2	>300	>300	6781	Inoculación efectiva de *C. albicans*
143	2.875 B5 3	>300	>300	6456	
144	2.875 B5 4	>300	>300	6684	
145	2.875 B5 5	>300	>300	5481	
146	2.875 B6 1	>300	>300	6541	
147	2.875 B6 2	>300	>300	6582	Inoculación efectiva de *C. albicans*
148	2.875 B6 3	>300	>300	5947	
149	2.875 B6 4	>300	>300	5866	
150	2.875 B6 5	>300	>300	6361	
151	2.875 B7 1	>300	>300	7931	
152	2.875 B7 2	>300	>300	8143	Inoculación efectiva de *C. albicans*
133	2.875 B7 3	>300	>300	7899	
154	2.875 B7 4	>300	>300	8122	
155	2.875 B7 5	>300	>300	7964	
156	2.875 B8 1	>300	>300	6223	
157	2.875 B8 2	>300	>300	6194	Inoculación efectiva de *C. albicans*
158	2.875 B8 3	>300	>300	5963	
159	2.875 B8 4	>300	>300	5947	
160	2.875 B8 5	>300	>300	6093	

Tabla VII.6.3. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con Dnn.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.359 B1 1	180	180	35	
2	0.359 B1 2	180	180	46	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
3	0.359 B1 3	180	180	49	
4	0.359 B1 4	180	180	63	
5	0.359 B1 5	180	180	69	
6	0.359 B2 1	>300	>300	343	
7	0.359 B2 2	>300	>300	365	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
8	0.359 B2 3	>300	>300	347	
9	0.359 B2 4	>300	>300	309	
10	0.359 B2 5	>300	>300	321	
11	0.359 B3 1	>300	>300	247	
12	0.359 B3 2	>300	>300	205	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
13	0.359 B3 3	>300	>300	217	
14	0.359 B3 4	>300	>300	226	
15	0.359 B3 5	>300	>300	231	
16	0.359 B4 1	>300	>300	194	
17	0.359 B4 2	>300	>300	183	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
18	0.359 B4 3	>300	>300	193	
19	0.359 B4 4	>300	>300	197	
20	0.359 B4 5	>300	>300	203	
21	0.359 B5 1	>300	>300	145	
22	0.359 B5 2	>300	>300	136	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
23	0.359 B5 3	>300	>300	166	
24	0.359 B5 4	>300	>300	197	
25	0.359 B5 5	>300	>300	184	
26	0.359 B6 1	>300	>300	185	
27	0.359 B6 2	>300	>300	189	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
28	0.359 B6 3	>300	>300	204	
29	0.359 B6 4	>300	>300	193	
30	0.359 B6 5	>300	>300	163	
31	0.359 B7 1	>300	>300	348	
32	0.359 B7 2	>300	>300	560	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
33	0.359 B7 3	>300	>300	580	
34	0.359 B7 4	>300	>300	593	
35	0.359 B7 5	>300	>300	601	
36	0.359 B8 1	>300	>300	234	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
37	0.359 B8 2	>300	>300	261	
38	0.359 B8 3	>300	>300	217	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.359 B8 4	>300	>300	221	
40	0.359 B8 5	>300	>300	231	
41	0.718 B1 1	>300	>300	641	Inoculación efectiva de *C. albicans*
42	0.718 B1 2	>300	>300	653	
43	0.718 B1 3	>300	>300	687	
44	0.718 B1 4	>300	>300	631	
45	0.718 B1 5	>300	>300	617	
46	0.718 B2 1	>300	>300	523	Inoculación efectiva de *C. albicans*
47	0.718 B2 2	>300	>300	581	
48	0.718 B2 3	>300	>300	536	
49	0.718 B2 4	>300	>300	461	
50	0.718 B2 5	>300	>300	423	
51	0.718 B3 1	>300	>300	157	Inoculación efectiva de *C. albicans*
52	0.718 B3 2	>300	>300	135	
53	0.718 B3 3	>300	>300	185	
54	0.718 B3 4	>300	>300	176	
55	0.718 B3 5	>300	>300	161	
56	0.718 B4 1	>300	>300	222	Inoculación efectiva de *C. albicans*
57	0.718 B4 2	>300	>300	231	
58	0.718 B4 3	>300	>300	229	
59	0.718 B4 4	>300	>300	241	
60	0.718 B4 5	>300	>300	263	
61	0.718 B5 1	>300	>300	196	Inoculación efectiva de *C. albicans*
62	0.718 B5 2	>300	>300	203	
63	0.718 B5 3	>300	>300	175	
64	0.718 B5 4	>300	>300	183	
65	0.718 B5 5	>300	>300	174	
66	0.718 B6 1	>300	>300	1507	Inoculación efectiva de *C. albicans*
67	0.718 B6 2	>300	>300	1545	
68	0.718 B6 3	>300	>300	1661	
69	0.718 B6 4	>300	>300	1594	
70	0.718 B6 5	>300	>300	1640	
71	0.718 B7 1	>300	>300	1543	Inoculación efectiva de *C. albicans*
72	0.718 B7 2	>300	>300	1589	
73	0.718 B7 3	>300	>300	1763	
74	0.718 B7 4	>300	>300	1695	
75	0.718 B7 5	>300	>300	1681	
76	0.718 B8 1	>300	>300	99	Inoculación efectiva de *C. albicans*
77	0.718 B8 2	>300	>300	95	
78	0.718 B8 3	>300	>300	84	
79	0.718 B8 4	>300	>300	90	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	0.718 B8 5	>300	>300	81	
81	1.4375 B1 1	>300	>300	5485	
82	1.4375 B1 2	>300	>300	5623	Inoculación
83	1.4375 B1 3	>300	>300	5835	efectiva de *C.*
84	1.4375 B1 4	>300	>300	5617	*albicans*
85	1.4375 B1 5	>300	>300	5661	
86	1.4375 B2 1	>300	>300	8441	
87	1.4375 B2 2	>300	>300	8221	Inoculación
88	1.4375 B2 3	>300	>300	8161	efectiva de *C.*
89	1.4375 B2 4	>300	>300	8021	*albicans*
90	1.4375 B2 5	>300	>300	8553	
91	1.4375 B3 1	>300	>300	6420	
92	1.4375 B3 2	>300	>300	6563	Inoculación
93	1.4375 B3 3	>300	>300	6521	efectiva de *C.*
94	1.4375 B3 4	>300	>300	6547	*albicans*
95	1.4375 B3 5	>300	>300	6825	
96	1.4375 B4 1	>300	>300	647	
97	1.4375 B4 2	>300	>300	625	Inoculación
98	1.4375 B4 3	>300	>300	685	efectiva de *C.*
99	1.4375 B4 4	>300	>300	625	*albicans*
100	1.4375 B4 5	>300	>300	630	
101	1.4375 B5 1	>300	>300	1143	
102	1.4375 B5 2	>300	>300	1391	Inoculación
103	1.4375 B5 3	>300	>300	1349	efectiva de *C.*
104	1.4375 B5 4	>300	>300	1360	*albicans*
105	1.4375 B5 5	>300	>300	1289	
106	1.4375 B6 1	>300	>300	459	
107	1.4375 B6 2	>300	>300	424	Inoculación
108	1.4375 B6 3	>300	>300	436	efectiva de *C.*
109	1.4375 B6 4	>300	>300	461	*albicans*
110	1.4375 B6 5	>300	>300	420	
111	1.4375 B7 1	>300	>300	3431	
112	1.4375 B7 2	>300	>300	3661	Inoculación
113	1.4375 B7 3	>300	>300	3521	efectiva de *C.*
114	1.4375 B7 4	>300	>300	3731	*albicans*
115	1.4375 B7 5	>300	>300	3547	
116	1.4375 B8 1	>300	>300	1771	
117	1.4375 B8 2	>300	>300	1821	Inoculación
118	1.4375 B8 3	>300	>300	1843	efectiva de *C.*
119	1.4375 B8 4	>300	>300	1865	*albicans*
120	1.4375 B8 5	>300	>300	1904	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.875 B1 1	>300	>300	3761	Inoculación efectiva de *C. albicans*
122	2.875 B1 2	>300	>300	3841	
123	2.875 B1 3	>300	>300	3921	
124	2.875 B1 4	>300	>300	3940	
125	2.875 B1 5	>300	>300	3922	
126	2.875 B2 1	>300	>300	4229	Inoculación efectiva de *C. albicans*
127	2.875 B2 2	>300	>300	4354	
128	2.875 B2 3	>300	>300	4222	
129	2.875 B2 4	>300	>300	4294	
130	2.875 B2 5	>300	>300	4195	
131	2.875 B3 1	>300	>300	5001	Inoculación efectiva de *C. albicans*
132	2.875 B3 2	>300	>300	5093	
133	2.875 B3 3	>300	>300	5125	
134	2.875 B3 4	>300	>300	5115	
135	2.875 B3 5	>300	>300	5105	
136	2.875 B4 1	>300	>300	6032	Inoculación efectiva de *C. albicans*
137	2.875 B4 2	>300	>300	6121	
138	2.875 B4 3	>300	>300	6335	
139	2.875 B4 4	>300	>300	6295	
140	2.875 B4 5	>300	>300	6339	
141	2.875 B5 1	>300	>300	4885	Inoculación efectiva de *C. albicans*
142	2.875 B5 2	>300	>300	4569	
143	2.875 B5 3	>300	>300	4695	
144	2.875 B5 4	>300	>300	4789	
145	2.875 B5 5	>300	>300	4623	
146	2.875 B6 1	>300	>300	3861	Inoculación efectiva de *C. albicans*
147	2.875 B6 2	>300	>300	3515	
148	2.875 B6 3	>300	>300	3721	
149	2.875 B6 4	>300	>300	3822	
150	2.875 B6 5	>300	>300	3621	
151	2.875 B7 1	>300	>300	5625	Inoculación efectiva de *C. albicans*
152	2.875 B7 2	>300	>300	5585	
133	2.875 B7 3	>300	>300	5520	
154	2.875 B7 4	>300	>300	5385	
155	2.875 B7 5	>300	>300	5511	
156	2.875 B8 1	>300	>300	6431	Inoculación efectiva de *C. albicans*
157	2.875 B8 2	>300	>300	6722	
158	2.875 B8 3	>300	>300	6569	
159	2.875 B8 4	>300	>300	6789	
160	2.875 B8 5	>300	>300	6620	

Tabla VII.6.4. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con Ger.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.359 B1 1	0	0	0	
2	0.359 B1 2	0	0	10	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
3	0.359 B1 3	0	0	0	
4	0.359 B1 4	0	0	0	
5	0.359 B1 5	0	0	10	
6	0.359 B2 1	0	0	0	
7	0.359 B2 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
8	0.359 B2 3	0	0	10	
9	0.359 B2 4	0	0	0	
10	0.359 B2 5	0	0	0	
11	0.359 B3 1	0	0	0	
12	0.359 B3 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
13	0.359 B3 3	0	0	0	
14	0.359 B3 4	0	0	0	
15	0.359 B3 5	0	0	0	
16	0.359 B4 1	0	0	10	
17	0.359 B4 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
18	0.359 B4 3	0	0	10	
19	0.359 B4 4	0	0	0	
20	0.359 B4 5	0	0	10	
21	0.359 B5 1	0	0	10	
22	0.359 B5 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
23	0.359 B5 3	0	0	0	
24	0.359 B5 4	0	0	10	
25	0.359 B5 5	0	0	0	
26	0.359 B6 1	0	0	10	
27	0.359 B6 2	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
28	0.359 B6 3	0	0	0	
29	0.359 B6 4	0	0	0	
30	0.359 B6 5	0	0	0	
31	0.359 B7 1	0	0	10	
32	0.359 B7 2	0	0	20	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
33	0.359 B7 3	0	0	0	
34	0.359 B7 4	0	0	0	
35	0.359 B7 5	0	0	0	
36	0.359 B8 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
37	0.359 B8 2	0	0	10	
38	0.359 B8 3	0	0	10	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.359 B8 4	0	0	20	
40	0.359 B8 5	0	0	10	
41	0.718 B1 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
42	0.718 B1 2	0	0	0	
43	0.718 B1 3	0	0	0	
44	0.718 B1 4	0	0	0	
45	0.718 B1 5	0	0	10	
46	0.718 B2 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
47	0.718 B2 2	0	0	0	
48	0.718 B2 3	0	0	10	
49	0.718 B2 4	0	0	0	
50	0.718 B2 5	0	0	0	
51	0.718 B3 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
52	0.718 B3 2	0	0	0	
53	0.718 B3 3	0	0	0	
54	0.718 B3 4	0	0	0	
55	0.718 B3 5	0	0	10	
56	0.718 B4 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
57	0.718 B4 2	0	0	10	
58	0.718 B4 3	0	0	0	
59	0.718 B4 4	0	0	0	
60	0.718 B4 5	0	0	10	
61	0.718 B5 1	0	0	29	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
62	0.718 B5 2	0	0	0	
63	0.718 B5 3	0	0	0	
64	0.718 B5 4	0	0	0	
65	0.718 B5 5	0	0	0	
66	0.718 B6 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
67	0.718 B6 2	0	0	0	
68	0.718 B6 3	0	0	0	
69	0.718 B6 4	0	0	10	
70	0.718 B6 5	0	0	0	
71	0.718 B7 1	0	0	10	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
72	0.718 B7 2	0	0	10	
73	0.718 B7 3	0	0	10	
74	0.718 B7 4	0	0	0	
75	0.718 B7 5	0	0	20	
76	0.718 B8 1	0	0	0	Inoculación no efectiva de *C. albicans*
77	0.718 B8 2	0	0	0	
78	0.718 B8 3	0	0	0	
79	0.718 B8 4	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	0.718 B8 5	0	0	0	
81	1.4375 B1 1	0	0	0	
82	1.4375 B1 2	0	0	0	Inoculación no
83	1.4375 B1 3	0	0	0	efectiva de *C.*
84	1.4375 B1 4	0	0	29	*albicans*
85	1.4375 B1 5	0	0	0	
86	1.4375 B2 1	0	0	0	
87	1.4375 B2 2	0	0	0	Inoculación no
88	1.4375 B2 3	0	0	0	efectiva de *C.*
89	1.4375 B2 4	0	0	0	*albicans*
90	1.4375 B2 5	0	0	10	
91	1.4375 B3 1	0	0	0	
92	1.4375 B3 2	0	0	0	Inoculación no
93	1.4375 B3 3	0	0	10	efectiva de *C.*
94	1.4375 B3 4	0	0	0	*albicans*
95	1.4375 B3 5	0	0	29	
96	1.4375 B4 1	0	0	0	
97	1.4375 B4 2	0	0	10	Inoculación no
98	1.4375 B4 3	0	0	0	efectiva de *C.*
99	1.4375 B4 4	0	0	0	*albicans*
100	1.4375 B4 5	0	0	0	
101	1.4375 B5 1	0	0	0	
102	1.4375 B5 2	0	0	10	Inoculación no
103	1.4375 B5 3	0	0	0	efectiva de *C.*
104	1.4375 B5 4	0	0	0	*albicans*
105	1.4375 B5 5	0	0	0	
106	1.4375 B6 1	0	0	10	
107	1.4375 B6 2	0	0	10	Inoculación no
108	1.4375 B6 3	0	0	10	efectiva de *C.*
109	1.4375 B6 4	0	0	0	*albicans*
110	1.4375 B6 5	0	0	0	
111	1.4375 B7 1	0	0	0	
112	1.4375 B7 2	0	0	10	Inoculación no
113	1.4375 B7 3	0	0	10	efectiva de *C.*
114	1.4375 B7 4	0	0	0	*albicans*
115	1.4375 B7 5	0	0	20	
116	1.4375 B8 1	0	0	0	
117	1.4375 B8 2	0	0	0	Inoculación no
118	1.4375 B8 3	0	0	0	efectiva de *C.*
119	1.4375 B8 4	0	0	0	*albicans*
120	1.4375 B8 5	0	0	0	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.875 B1 1	0	0	0	
122	2.875 B1 2	0	0	0	Inoculación no
123	2.875 B1 3	0	0	0	efectiva de *C.*
124	2.875 B1 4	0	0	10	*albicans*
125	2.875 B1 5	0	0	0	
126	2.875 B2 1	0	0	0	
127	2.875 B2 2	0	0	20	Inoculación no
128	2.875 B2 3	0	0	0	efectiva de *C.*
129	2.875 B2 4	0	0	0	*albicans*
130	2.875 B2 5	0	0	0	
131	2.875 B3 1	0	0	10	
132	2.875 B3 2	0	0	0	Inoculación no
133	2.875 B3 3	0	0	0	efectiva de *C.*
134	2.875 B3 4	0	0	10	*albicans*
135	2.875 B3 5	0	0	29	
136	2.875 B4 1	0	0	19	
137	2.875 B4 2	0	0	10	Inoculación no
138	2.875 B4 3	0	0	0	efectiva de *C.*
139	2.875 B4 4	0	0	0	*albicans*
140	2.875 B4 5	0	0	0	
141	2.875 B5 1	0	0	10	
142	2.875 B5 2	0	0	0	Inoculación no
143	2.875 B5 3	0	0	10	efectiva de *C.*
144	2.875 B5 4	0	0	0	*albicans*
145	2.875 B5 5	0	0	0	
146	2.875 B6 1	0	0	10	
147	2.875 B6 2	0	0	0	Inoculación no
148	2.875 B6 3	0	0	0	efectiva de *C.*
149	2.875 B6 4	0	0	0	*albicans*
150	2.875 B6 5	0	0	0	
151	2.875 B7 1	0	0	0	
152	2.875 B7 2	0	0	10	Inoculación no
133	2.875 B7 3	0	0	0	efectiva de *C.*
154	2.875 B7 4	0	0	0	*albicans*
155	2.875 B7 5	0	0	10	
156	2.875 B8 1	0	0	0	
157	2.875 B8 2	0	0	0	Inoculación no
158	2.875 B8 3	0	0	0	efectiva de *C.*
159	2.875 B8 4	0	0	0	*albicans*
160	2.875 B8 5	0	0	0	

Tabla VII.6.5. Datos obtenidos mediante el método alternativo correspondientes a la inoculación controlada de *Candida albicans* con gel Nel.

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
1	0.359 B1 1	190	190	55	
2	0.359 B1 2	190	190	29	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
3	0.359 B1 3	190	190	69	
4	0.359 B1 4	190	190	55	
5	0.359 B1 5	190	190	38	
6	0.359 B2 1	>300	>300	193	
7	0.359 B2 2	>300	>300	173	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
8	0.359 B2 3	>300	>300	177	
9	0.359 B2 4	>300	>300	185	
10	0.359 B2 5	>300	>300	181	
11	0.359 B3 1	>300	>300	203	
12	0.359 B3 2	>300	>300	211	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
13	0.359 B3 3	>300	>300	224	
14	0.359 B3 4	>300	>300	219	
15	0.359 B3 5	>300	>300	236	
16	0.359 B4 1	>300	>300	20	
17	0.359 B4 2	>300	>300	39	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
18	0.359 B4 3	>300	>300	67	
19	0.359 B4 4	>300	>300	75	
20	0.359 B4 5	>300	>300	29	
21	0.359 B5 1	>300	>300	225	
22	0.359 B5 2	>300	>300	263	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
23	0.359 B5 3	>300	>300	241	
24	0.359 B5 4	>300	>300	249	
25	0.359 B5 5	>300	>300	256	
26	0.359 B6 1	>300	>300	191	
27	0.359 B6 2	>300	>300	184	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
28	0.359 B6 3	>300	>300	190	
29	0.359 B6 4	>300	>300	177	
30	0.359 B6 5	>300	>300	195	
31	0.359 B7 1	>300	>300	364	
32	0.359 B7 2	>300	>300	232	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
33	0.359 B7 3	>300	>300	300	
34	0.359 B7 4	>300	>300	378	
35	0.359 B7 5	>300	>300	380	
36	0.359 B8 1	>300	>300	222	**Inoculación efectiva de *C. albicans***
37	0.359 B8 2	>300	>300	235	
38	0.359 B8 3	>300	>300	241	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
39	0.359 B8 4	>300	>300	227	
40	0.359 B8 5	>300	>300	270	
41	0.718 B1 1	>300	>300	171	
42	0.718 B1 2	>300	>300	165	Inoculación
43	0.718 B1 3	>300	>300	181	efectiva de *C.*
44	0.718 B1 4	>300	>300	177	*albicans*
45	0.718 B1 5	>300	>300	181	
46	0.718 B2 1	>300	>300	320	
47	0.718 B2 2	>300	>300	333	Inoculación
48	0.718 B2 3	>300	>300	367	efectiva de *C.*
49	0.718 B2 4	>300	>300	381	*albicans*
50	0.718 B2 5	>300	>300	372	
51	0.718 B3 1	>300	>300	104	
52	0.718 B3 2	>300	>300	117	Inoculación
53	0.718 B3 3	>300	>300	123	efectiva de *C.*
54	0.718 B3 4	>300	>300	113	*albicans*
55	0.718 B3 5	>300	>300	125	
56	0.718 B4 1	>300	>300	275	
57	0.718 B4 2	>300	>300	263	Inoculación
58	0.718 B4 3	>300	>300	251	efectiva de *C.*
59	0.718 B4 4	>300	>300	231	*albicans*
60	0.718 B4 5	>300	>300	245	
61	0.718 B5 1	>300	>300	133	
62	0.718 B5 2	>300	>300	168	Inoculación
63	0.718 B5 3	>300	>300	153	efectiva de *C.*
64	0.718 B5 4	>300	>300	143	*albicans*
65	0.718 B5 5	>300	>300	177	
66	0.718 B6 1	>300	>300	1057	
67	0.718 B6 2	>300	>300	1227	Inoculación
68	0.718 B6 3	>300	>300	1341	efectiva de *C.*
69	0.718 B6 4	>300	>300	1231	*albicans*
70	0.718 B6 5	>300	>300	1322	
71	0.718 B7 1	>300	>300	2435	
72	0.718 B7 2	>300	>300	2387	Inoculación
73	0.718 B7 3	>300	>300	2421	efectiva de *C.*
74	0.718 B7 4	>300	>300	2247	*albicans*
75	0.718 B7 5	>300	>300	2235	
76	0.718 B8 1	>300	>300	29	Inoculación
77	0.718 B8 2	>300	>300	40	efectiva de *C.*
78	0.718 B8 3	>300	>300	69	*albicans*
79	0.718 B8 4	>300	>300	30	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
80	0.718 B8 5	>300	>300	29	
81	1.4375 B1 1	>300	>300	4576	
82	1.4375 B1 2	>300	>300	4687	Inoculación
83	1.4375 B1 3	>300	>300	5523	efectiva de *C.*
84	1.4375 B1 4	>300	>300	5276	*albicans*
85	1.4375 B1 5	>300	>300	5227	
86	1.4375 B2 1	>300	>300	4412	
87	1.4375 B2 2	>300	>300	4782	Inoculación
88	1.4375 B2 3	>300	>300	4760	efectiva de *C.*
89	1.4375 B2 4	>300	>300	4522	*albicans*
90	1.4375 B2 5	>300	>300	4531	
91	1.4375 B3 1	>300	>300	6780	
92	1.4375 B3 2	>300	>300	6561	Inoculación
93	1.4375 B3 3	>300	>300	6622	efectiva de *C.*
94	1.4375 B3 4	>300	>300	6675	*albicans*
95	1.4375 B3 5	>300	>300	6684	
96	1.4375 B4 1	>300	>300	384	
97	1.4375 B4 2	>300	>300	325	Inoculación
98	1.4375 B4 3	>300	>300	363	efectiva de *C.*
99	1.4375 B4 4	>300	>300	354	*albicans*
100	1.4375 B4 5	>300	>300	361	
101	1.4375 B5 1	>300	>300	654	
102	1.4375 B5 2	>300	>300	695	Inoculación
103	1.4375 B5 3	>300	>300	774	efectiva de *C.*
104	1.4375 B5 4	>300	>300	725	*albicans*
105	1.4375 B5 5	>300	>300	717	
106	1.4375 B6 1	>300	>300	423	
107	1.4375 B6 2	>300	>300	407	Inoculación
108	1.4375 B6 3	>300	>300	454	efectiva de *C.*
109	1.4375 B6 4	>300	>300	433	*albicans*
110	1.4375 B6 5	>300	>300	465	
111	1.4375 B7 1	>300	>300	2461	
112	1.4375 B7 2	>300	>300	3470	Inoculación
113	1.4375 B7 3	>300	>300	2825	efectiva de *C.*
114	1.4375 B7 4	>300	>300	2764	*albicans*
115	1.4375 B7 5	>300	>300	2658	
116	1.4375 B8 1	>300	>300	11465	
117	1.4375 B8 2	>300	>300	11720	Inoculación
118	1.4375 B8 3	>300	>300	11525	efectiva de *C.*
119	1.4375 B8 4	>300	>300	11674	*albicans*
120	1.4375 B8 5	>300	>300	12125	

Número[a]	Muestra [b]	MTS [c]	MTG [d]	Contaje/mL[e]	Observaciones [f]
121	2.875 B1 1	>300	>300	7721	
122	2.875 B1 2	>300	>300	7922	Inoculación
123	2.875 B1 3	>300	>300	7785	efectiva de *C.*
124	2.875 B1 4	>300	>300	7647	*albicans*
125	2.875 B1 5	>300	>300	7785	
126	2.875 B2 1	>300	>300	4373	
127	2.875 B2 2	>300	>300	4547	Inoculación
128	2.875 B2 3	>300	>300	4677	efectiva de *C.*
129	2.875 B2 4	>300	>300	4469	*albicans*
130	2.875 B2 5	>300	>300	4565	
131	2.875 B3 1	>300	>300	5336	
132	2.875 B3 2	>300	>300	5391	Inoculación
133	2.875 B3 3	>300	>300	5764	efectiva de *C.*
134	2.875 B3 4	>300	>300	5625	*albicans*
135	2.875 B3 5	>300	>300	6576	
136	2.875 B4 1	>300	>300	4332	
137	2.875 B4 2	>300	>300	4826	Inoculación
138	2.875 B4 3	>300	>300	4933	efectiva de *C.*
139	2.875 B4 4	>300	>300	4526	*albicans*
140	2.875 B4 5	>300	>300	5003	
141	2.875 B5 1	>300	>300	6112	
142	2.875 B5 2	>300	>300	6316	Inoculación
143	2.875 B5 3	>300	>300	6385	efectiva de *C.*
144	2.875 B5 4	>300	>300	6933	*albicans*
145	2.875 B5 5	>300	>300	6444	
146	2.875 B6 1	>300	>300	3927	
147	2.875 B6 2	>300	>300	3786	Inoculación
148	2.875 B6 3	>300	>300	3771	efectiva de *C.*
149	2.875 B6 4	>300	>300	3520	*albicans*
150	2.875 B6 5	>300	>300	3675	
151	2.875 B7 1	>300	>300	5885	
152	2.875 B7 2	>300	>300	5399	Inoculación
133	2.875 B7 3	>300	>300	5431	efectiva de *C.*
154	2.875 B7 4	>300	>300	5562	*albicans*
155	2.875 B7 5	>300	>300	5431	
156	2.875 B8 1	>300	>300	6020	
157	2.875 B8 2	>300	>300	6331	Inoculación
158	2.875 B8 3	>300	>300	6571	efectiva de *C.*
159	2.875 B8 4	>300	>300	5927	*albicans*
160	2.875 B8 5	>300	>300	5930	