

## Artículo original

### Asas metálicas calibradas para microbiólogos: una alternativa de fabricación nacional

Dubraska Herrera<sup>a</sup>, Patricia López<sup>a</sup>, José Luis Duque Rivera<sup>a</sup>, Luis Pérez Ybarra<sup>a</sup>, Rafael Golding<sup>b</sup>, Clara Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciencia Básicas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua. <sup>b</sup>Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Recibido 23 de noviembre de 2009; aceptado 7 de junio de 2010

**Resumen:** Las asas calibradas para la cuantificación de unidades formadoras de colonias bacterianas transfieren un volumen de muestra “exactamente conocido” y han sido herramientas de gran importancia para laboratorios de control de calidad, investigación y clínico. Las asas que se comercializan en el país son importadas y mayoritariamente de aleaciones de níquel-cromo. Es por ello que surge la necesidad de buscar internamente alternativas de bajo costo. En este trabajo se propuso la fabricación de asas con alambres comerciales de níquel-cromo equivalentes a las asas de platino y níquel-cromo comerciales, a un costo inferior. Las asas fueron comparadas según su desempeño y apariencia. Todas las asas fueron calibradas empleando dos métodos (gravimétrico y colorimétrico) con ángulos de carga de 45° y 90°. Se empleó un diseño experimental con arreglo factorial de tratamiento 2<sup>3</sup> (método de calibración-tipo de asa-ángulo de carga, con 4 repeticiones). Se realizaron análisis de varianza de 672 datos, comparación de medias (prueba de Tukey) y se calcularon los intervalos de confianza de Bonferroni de las desviaciones estándar. Se demostró que las asas artesanales emulan a las comerciales, representando una alternativa nacional de bajo costo para la obtención de estos instrumentos.

**Palabras clave:** asas calibradas, asas de níquel-cromo

### Calibrated metallic loops for microbiologists: a nationally manufactured alternative

**Abstract:** Calibrated metallic loops for the quantification of bacterial colony forming units transfer an “exactly known” sample volume and have been extremely important tools for quality control, research and clinical laboratories. The loops marketed in our country are imported and mostly made of nickel-chrome alloy. This has created the need for searching for low cost national alternatives. In this work we propose the manufacture of these loops with commercial nickel-chrome wire equivalent to the commercial platinum and nickel-chrome loops, at lower costs. The loops were comparable in performance and appearance. All the loops were calibrated using two methods (gravimetric and colorimetric) with 45° and 90° charge angles. An experimental design with factorial treatment arrangement 2<sup>3</sup> (calibration method-loop type-charge angle with 4 repetitions) was used. A 672 data variance analysis and comparison of means (Tukey’s test) were carried out, and Bonferroni’s confidence intervals of the standard deviations were calculated. It was demonstrated that the artisan loops emulated the commercial ones, representing a low cost national alternative for obtaining these instruments.

**Keywords:** calibrated loops, nickel-chrome loops

\* Correspondencia:

E-mail: cmhm3105@yahoo.com

#### Introducción

Para la cuantificación de bacterias en suspensiones de fluidos biológicos, las asas calibradas, tanto metálicas como plásticas, han sido herramientas imprescindibles en el laboratorio clínico. Entre las ventajas de las asas calibradas de metal con respecto a las plásticas desechables, se tiene que son más eficientes en la siembra de cultivos, son de fácil manipulación, y además permiten realizar contajes semi-cuantitativos de distintas bacterias con mayor certeza.

La principal desventaja radica en su alto costo, ya que las asas son importadas y fabricadas con metales nobles, lo que dificulta que muchos laboratorios de bajo presupuesto puedan adquirirlas.

La primera asa metálica calibrada de las que se tiene conocimiento fue descrita en 1928 [1]. Son ideales para el contaje cuantitativo de colonias porque permiten la reexaminación bacteriológica [2-5]. Específicamente, las asas de platino de 1 y 10  $\mu$ L son ampliamente utilizadas en la determinación de unidades formadoras de colonias

(UFC) en distintos fluidos biológicos, tanto en laboratorios clínicos y docentes como de investigación. También se emplean para cuantificar micoplasmas y permiten realizar la siembra de diversos microorganismos [1].

Las asas están diseñadas para transferir un volumen de muestra "exactamente conocido" y sigue siendo el método más recomendado por muchos laboratorios de microbiología [6]. La precisión y exactitud de estos instrumentos debe ser garantizada por el proveedor, puesto que en el caso de una transferencia inadecuada de la muestra, el resultado de un análisis reportado por el especialista podría conducir a interpretaciones erróneas por parte del médico tratante, generando un diagnóstico inapropiado.

Existen dos métodos convencionales de estandarización de asas para la transferencia de fluidos: el colorimétrico, método indirecto basado en la ley de Lambert-Beer para asas de volúmenes pequeños, y el gravimétrico, método directo basado en medidas de masa y recomendado para asas de volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  en adelante [7]. El método colorimétrico consiste en hacer pasar una radiación electromagnética de la región visible por una solución de concentración conocida. La absorbancia, una medida de la absorción de luz que experimenta una solución coloreada es directamente proporcional a la concentración de la solución (Ley de Lambert-Beer) [8]. Un volumen conocido de agua, contenido en una cubeta fotométrica, es teñido con la solución que muestrea el asa en estudio. Mediante una curva de calibración preparada con el mismo colorante se puede determinar la cantidad de colorante inoculada por el asa en la cubeta, la cual depende del volumen real muestreado por el asa.

Por otra parte, el método gravimétrico consiste en la transferencia de un número de alícuotas de una muestra (agua destilada por ejemplo) a un papel de filtro colocado en el platillo de una balanza de alta precisión [1, 3, 5]. Conocidas la densidad del líquido transportado, la temperatura y la presión atmosférica, es posible calcular el volumen cargado por el asa.

La Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) ha certificado un método de control de calidad para asas de metal un tanto diferente a los anteriormente discutidos. Se ha empleado este método para estudio de productos lácteos utilizando asas calibradas de níquel-cromo (diámetro del alambre 0,20 $\pm$ 0,06 mm) de 0,001 mL. El método requiere una barra de metal de dos calibres. En un extremo 3,988 mm y en el otro 4,039 mm. Simplemente se intenta desplazar el aro a calibrar por ambos extremos de la barra. Si el asa está calibrada (forma y volumen correctos) debe solamente entrar por el extremo de menor calibre, si el asa pasa a través del extremo de mayor calibre, ésta requerirá ajustes. El procedimiento es rápido con un alto grado de exactitud, el error del método no es mayor al 1% [9], superando ostensiblemente a los métodos colorimétricos cuyo errores pueden ser de hasta 20%.

Las asas para la transferencia de fluidos, en cualquiera de sus presentaciones, deben ser calibradas dada la necesidad de conocer con precisión y exactitud los volúmenes de

muestra que inoculan, y deben conseguirse en estado estéril, o ser esterilizables por métodos convencionales sin que se comprometa su desempeño.

El platino, aleado con otros metales como el rodio, ha sido por excelencia el metal más empleado en la fabricación de asas. El metal puede ser esterilizado a la llama, pero por ser muy blando y deformable, suele perderse la calibración con facilidad por cambios en la forma del aro.

En los laboratorios de docencia el uso de asas de platino muchas veces es de alcance limitado debido a los altos costos. Esto ha hecho popular el empleo de alambres de níquel-cromo (Ni-Cr), los cuales son aceptablemente buenos para la tarea. En consecuencia, una alternativa sencilla, económica e igualmente eficaz es la fabricación de asas con alambres comerciales de Ni-Cr de menor costo, mayor dureza y menos deformables; tales asas pueden ser manipuladas fácilmente, esterilizadas a la llama y empleadas en las mismas tareas en las que se utilizan las asas de platino de soporte duro. Por todo lo expuesto, el presente trabajo propone la fabricación de asas de metal, para la siembra de cultivos biológicos, con alambres de Ni-Cr empleando una metodología propia y un método de calibración rápido.

## Materiales y métodos

*Fabricación de asas:* Se emplearon segmentos de 20 cm de alambre de níquel-cromo 80:20 Nikrothal 80 (Kanthal) para construir asas con la misma apariencia de un asa comercial de 10  $\mu\text{L}$ . Para formar el aro se entorchó el alambre sobre una barra de acero cilíndrica de diámetro adecuado (mecha de taladro milimétrica). El aro se ajustó a un mango y de esta manera el asa quedó lista para ser calibrada.

*Calibración:* Se utilizaron 4 asas metálicas calibradas comerciales (Copan, California, USA, Lote 2288, 10  $\mu\text{L}$ , NICROM) y 4 artesanales fabricadas a semejanza de las comerciales. Para recolectar los inóculos se usó un recipiente de vidrio de 4 cm de diámetro de boca y 5 cm de altura. La solución empleada para inocular se colocó en el recipiente. Las asas fueron introducidas en el centro del recipiente manteniendo el ángulo requerido en cada caso (45° ó 90°), según el procedimiento reportado [3]. Todas las asas se calibraron por los métodos gravimétrico y colorimétrico.

*Método gravimétrico:* consistió en transferir con el asa a calibrar inóculos de agua desionizada (Milli Q plus system, Millipore) tomadas a 45° y 90° de inclinación desde el recipiente hacia un papel de filtro. Con cada asa y ángulo, fueron tomados 30 inóculos. En cada ocasión que se transfirió un inóculo se pesó el papel de filtro en una balanza analítica (Ohaus Adventurer, 0,1 mg) y se registró la masa en miligramos. Todas las mediciones se realizaron a 25°C, y se consideró 1 g/mL la densidad del agua desionizada.

*Método colorimétrico:* A partir de una solución comercial de violeta de genciana al 2% en agua (Química Farmacéutica ALBA-LOF S.A. Caracas - Venezuela) se prepararon 5 patrones diluidos del colorante con agua desionizada. Se elaboró la curva de calibración de absorbancia a 588 nm

(UV-Vis Espectronic Genesys 2, USA) *versus* concentración del colorante. Posteriormente, se colocó 1 mL de agua desionizada en una cubeta de cuarzo y se colectaron inóculos de solución coloreada con el asa a ser calibrada a 45 y 90° de inclinación respecto a la superficie del líquido y se determinó la absorbancia. Se tomaron 12 inóculos para cada asa y ángulo. Con la curva de calibración se obtuvo la concentración de colorante de la solución contenida en la cubeta y con este valor se calculó el volumen inoculado por el aro.

**Autocalibración:** Se construyó una herramienta metálica de doble calibre con dos mechas de taladro de diferentes diámetros. El diámetro de la mecha más delgada es el mismo de la barra de acero cilíndrica usada en la fabricación de las asas artesanales. El asa no calibrada se deslizó por la mecha de menor diámetro y se apretó con un alicate la base del aro contra la mecha (reformado) y luego se trató de deslizar el asa por la mecha de mayor diámetro. Cuando el asa se deslizó por la mecha más gruesa se repitió el reformado hasta que el aro adoptó el diámetro de la mecha más delgada.

**Análisis estadístico:** Una vez finalizada la metodología experimental se organizaron los 672 datos recabados. El diseño de experimentos utilizado fue completamente aleatorizado con arreglo factorial de tratamientos 2<sup>3</sup>. Los factores fueron los siguientes: el método de medida (gravimétrico y colorimétrico), el tipo de asa utilizada (comercial y artesanal) y el ángulo de carga (45° y 90°), con 4 repeticiones y tomando 30 y 12 inóculos (submuestras) para los métodos gravimétrico y colorimétrico, respectivamente. Para realizar el análisis estadístico se emplearon los programas en ambiente Windows SAS® (versión 9.0) y Minitab (versión 14.3). Se realizaron análisis de varianza, comparación de medias mediante la prueba de la diferencia honestamente significativa de Tukey, y finalmente, se determinaron los intervalos de confianza de Bonferroni de las desviaciones estándar.

## Resultados

En la figura 1 se puede apreciar el aspecto de las asas fabricadas artesanalmente. El calibre del alambre de Ni-Cr de las asas artesanales fue (0,45 ± 0,05) mm y el retorcido sobre la barra de acero cilíndrica generó un aro con un volumen de 6,14 µL calculado geoméricamente. Las asas comerciales poseen un volumen nominal de 10 µL, no obstante, el volumen de aro calculado geoméricamente es el mismo que el de las asas artesanales.

En la tabla 1 se resumen las significancias estadísticas de las pruebas de comparación de medias de Tukey realizadas para evaluar el desempeño de las asas Ni-Cr artesanales y comerciales de acuerdo a varias fuentes de variación. El análisis estadístico realizado con 672 datos permitió evaluar tres tipos de efectos: (1) los efectos simples, que consisten en la influencia que ejerce de forma independiente el método de calibración, el tipo de asa y el volumen de carga;

(2) las interacciones dobles, relativas a las variaciones que producen las combinaciones: método de calibración–tipo de asa, método de calibración–ángulo de carga y tipo de asa–ángulo de carga; y (3) la interacción triple, que permite detectar variaciones debidas a la conjugación de las tres fuentes de variación.



Figura 1. Asas comerciales (izquierda) y artesanales (derecha). Las asas comerciales tienen un volumen nominal de 10 µL según el fabricante. Todas las asas poseen un volumen calculado geoméricamente de 6,14 µL.

Tabla 1: Comparación de los volúmenes de carga de las asas mediante la prueba de medias de Tukey.

| Fuente de variación                        | p-valor <sup>a</sup> |
|--|----------------------|
| Ángulo de carga                            | <0,0001              |
| Método de calibración                      | <0,0001              |
| Tipo de asa                                | 0,0003               |
| Método – tipo de asa <sup>b</sup>          | 0,5793               |
| Método – ángulo <sup>b</sup>               | 0,8394               |
| Tipo de asa – ángulo <sup>b</sup>          | 0,3060               |
| Método – tipo de asa – ángulo <sup>b</sup> | 0,1164               |

<sup>a</sup> Se considera significativo un p-valor ≤ 0,05.

<sup>b</sup> Estos casos constituyen interacciones de las dos o tres fuentes de variación.

La prueba de comparación de medias de Tukey establece que hay diferencias altamente significativas en cuanto al ángulo de carga (p<0,0001), el método de calibración (p<0,0001) y el tipo de asa (p<0,0003). En la figura 2 se pueden observar en forma comparativa los volúmenes inoculados de las asas de acuerdo a diferentes fuentes de variación y sus respectivas desviaciones estándar, en función de las fuentes de variación mencionadas anteriormente.

Con respecto al ángulo de carga, se observa (Figura 2A) claramente que al realizar el muestreo a 45° de inclinación respecto a la superficie del líquido, el volumen promedio global de las asas casi duplica al correspondiente tomado a 90°. Esto refleja una fuerte dependencia del ángulo de carga con respecto al volumen que las asas en general retienen. Los volúmenes a 45° tienden a aproximarse al volumen calculado geoméricamente (6,14 µL), en consecuencia son significativamente menores a 10 µL; este último es el

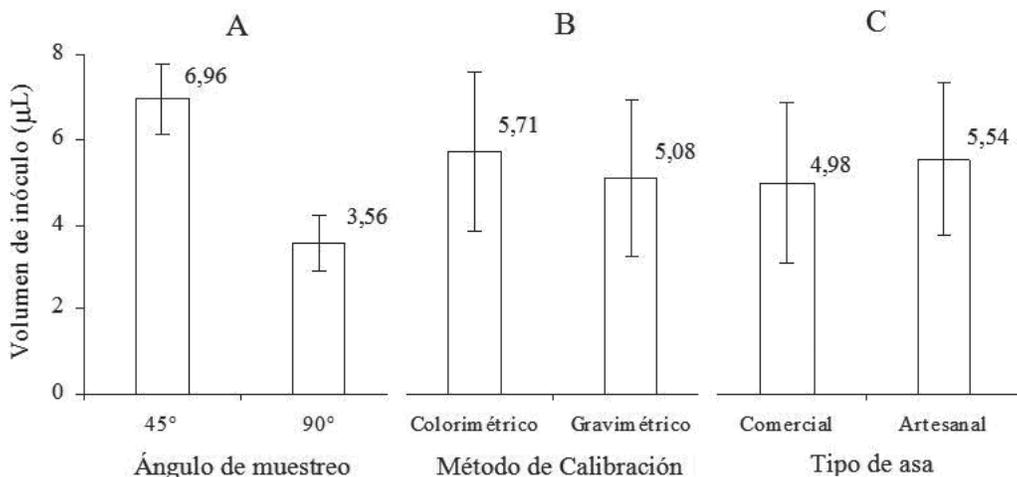


Figura 2. Comportamiento de los volúmenes inoculados de las asas de acuerdo a diferentes fuentes de variación simples. (A) Influencia del ángulo de carga (N=336 para cada media). (B) Efecto del método de calibración (N=192 y 480 para la medias de los métodos colorimétrico y gravimétrico, respectivamente). (C) Influencia del tipo de asa (N=336 para cada media).

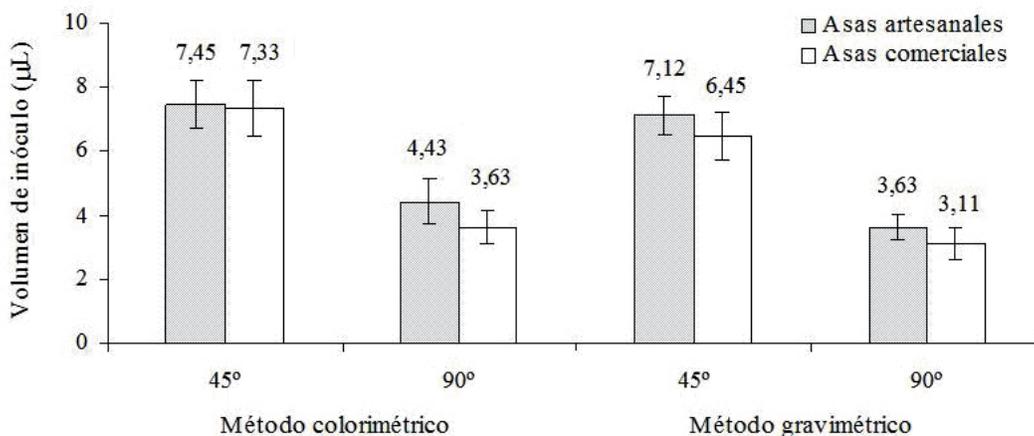


Figura 3. Comportamiento de los volúmenes inoculados de las asas debido a la interacción de las tres fuentes de variación: método de calibración, tipo de asa y ángulo de carga. N=48 y 120 para las medias de los métodos colorimétrico y gravimétrico, respectivamente.

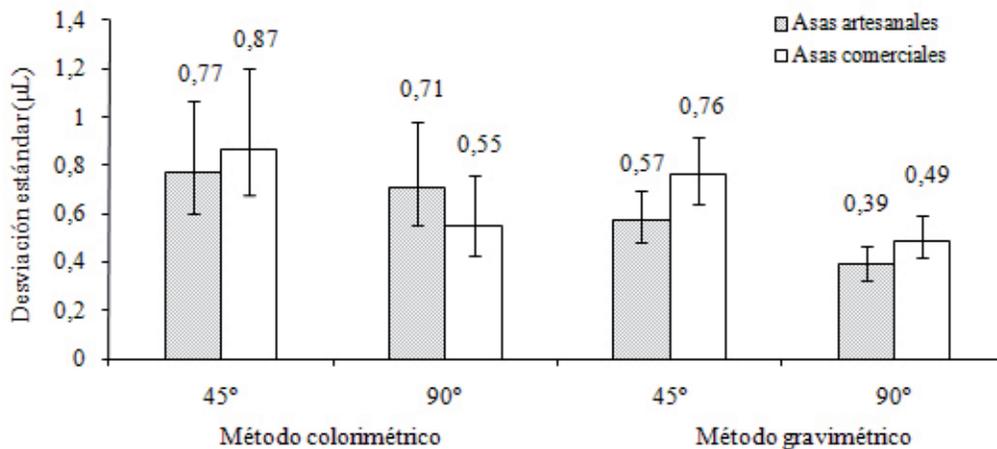


Figura 4: Precisión de los volúmenes inoculados de las asas. Las barras de error mostradas son los intervalos de confianza de Bonferroni para las desviaciones estándar. N=48 y 120 para las desviaciones de los métodos colorimétrico y gravimétrico, respectivamente.

volumen que el fabricante atribuye a sus asas comerciales.

En cuanto al método de calibración, se observa (Figura 2B) que el método colorimétrico tiende a indicar un volumen ligeramente superior al que es medido por el método gravimétrico (la diferencia es alrededor de 0,63  $\mu\text{L}$ ). Si bien la prueba de Tukey arroja que la diferencia es muy significativa, con fines prácticos, el comportamiento de los dos métodos de calibración es bastante homogéneo. Por otra parte, es natural que las medias en este caso se ubiquen alrededor de 5  $\mu\text{L}$  dado que cada media incluye a datos de los dos ángulos de carga.

En lo que se refiere al tipo de asa (Figura 2C), se establece que las asas artesanales toman un volumen ligeramente superior al correspondiente de las asas comerciales, la diferencia entre ambas asas es apenas 0,56  $\mu\text{L}$ , nuevamente para propósitos prácticos, el comportamiento de ambos tipos de asas es bastante homogéneo.

Las interacciones de dos y tres fuentes de variación no generaron diferencias significativas a través de la prueba de medias de Tukey (Tabla 1).

En la figura 3 se pueden apreciar las medias de los volúmenes de las asas de Ni-Cr desglosados de acuerdo al método de calibración, ángulo de carga, tipo de asa y las respectivas desviaciones estándar. En todos los casos las asas artesanales toman un volumen mayor; sin embargo, tales volúmenes no son significativamente diferentes. La figura 3 muestra nuevamente que sin importar el método de calibración y el tipo de asa, los volúmenes muestreados a 45° son bastantes mayores que los respectivos valores a 90°, pero más próximos a 6,14  $\mu\text{L}$  (el volumen geométrico de todas las asas) que a 10  $\mu\text{L}$  (el volumen nominal indicado por el fabricante de las asas comerciales).

La precisión de las asas se valoró mediante los intervalos de confianza de Bonferroni (Figura 4). Las desviaciones estándar son bajas y no superan la unidad; esto es concordante con el coeficiente de variación (%CV) global del experimento, ubicado en 11%, lo que significa que las asas tienden a medir el mismo volumen de forma reproducible. Los intervalos de confianza de Bonferroni, los cuales son indicados por las barras de error de la figura 4 se muestran bastante homogéneos entre sí. Sin embargo, en general los intervalos de confianza de las asas calibradas por el método colorimétrico son mayores que los correspondientes al método gravimétrico, evidenciando que la calibración gravimétrica tiende a ser más precisa.

## Discusión

Los resultados reseñados en este estudio muestran que las asas de Ni-Cr, fabricadas artesanalmente, tienen similar apariencia y se desempeñan de igual forma que las asas de procedencia comercial, fabricadas con la misma aleación.

Con respecto al ángulo de carga, Sarvin *et al* [10] afirman que la carga de un asa a 90° produce un valor menor que a ángulos inferiores. Esto es consistente con los datos observados en este estudio. Otro trabajo justifica que la masa de líquido recolectada en el aro de un asa cuando

éste se encuentra en posición vertical es menor debido al efecto de la gravedad y a la menor interacción del líquido-superficie del aro [11].

Los volúmenes de las asas, incluso las comerciales, son definitivamente menores a 10  $\mu\text{L}$  si se usan ángulos de carga de 45° ó 90°. Dado que es muy poca la información disponible sobre los métodos o protocolos de fabricación y calibración de las asas comerciales, no está clara cuál es la justificación de asignar volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  a asas fabricadas comercialmente cuya geometría indica que el volumen teórico de carga es 6,14  $\mu\text{L}$ .

Basados en los resultados expuestos en este trabajo y conforme a la literatura [1], no es prudente aceptar las especificaciones de asas que dan por sentado que el volumen de muestra tomado es igual al volumen nominal del asa que indica el fabricante, dado que existen varios factores que afectan la carga que toma un asa determinada. Entre ellos están el tipo de material del asa (la tensión interfacial muestra líquida-asa), la viscosidad de la solución empleada para inocular, densidad del inóculo, tamaño del recipiente de la muestra y ángulo de carga, entre otras variables [1,10,11].

Se ha reportado que la toma horizontal de muestra (ángulo de 0°) con asas de 1  $\mu\text{L}$  resulta en un volumen inoculado que es el doble de aquel cuando la muestra es recolectada a un ángulo de 90° [12]. En este trabajo, la tendencia de los volúmenes tomados a 45° y 90° permite inferir que a 0° los volúmenes de carga de las asas artesanales y comerciales podría superar el doble de los valores que se consiguen a 90°. Por lo tanto, el ángulo con el que se carga el asa, es claramente un factor determinante en el volumen que ésta cargará. Es interesante destacar que el personal del laboratorio clínico, de investigación y de docencia muestrea con las asas a 90° como práctica común, sin que exista una razón sustentada. Las conclusiones que se desprenden de este estudio apuntan a un cambio en la forma en que se toma la muestra con estos instrumentos o a un ajuste en el volumen de asa que se considera para los cálculos posteriores.

Es evidente el efecto que el ángulo de carga tiene sobre el volumen inoculado y la toma de inóculos a 90° implica muestreo por defecto, y en muchos casos podría llegar a obtenerse un conteo de microorganismos por debajo de la cantidad real, pudiéndose llegar a la conclusión errónea de asegurar la ausencia significativa de patógenos en la muestra.

El método colorimétrico ha sido recomendado para aquellos casos en los cuales una medida directa de masa no pueda efectuarse [1, 3, 5, 12] como en el caso de asas de 1  $\mu\text{L}$ . Aunque se ha demostrado que la calibración colorimétrica conduce a volúmenes ligeramente superiores a los de la calibración gravimétrica, con fines prácticos los métodos pueden ser considerados intercambiables; no obstante se sugiere para asas de volúmenes superiores a 1  $\mu\text{L}$  optar por el método gravimétrico, el cual es un método directo menos laborioso (el método colorimétrico requiere más pasos para su ejecución) y además los intervalos de Bonferroni sugieren que la calibración gravimétrica conlleva

mayor precisión.

La autocalibración se refiere a la calibración intrínseca que el método de fabricación lleva consigo. Con base en los resultados de estos experimentos, es evidente que todas las asas fabricadas de manera artesanal inoculan el volumen de muestra de manera bastante exacta y precisa respecto a las asas comerciales. Por lo antes expuesto queda en evidencia que un asa artesanal, fabricada con una herramienta apropiada y bajo los controles de fabricación establecidos en el protocolo, puede considerarse “calibrada” en función del volumen geométrico. Este volumen tendrá un error de  $\pm 1 \mu\text{L}$  para un asa considerada nominalmente de  $10 \mu\text{L}$ . Por otra parte, con el uso de la herramienta metálica de doble calibre se pueden recalibrar las asas cada vez que éstas lo ameriten, de forma rápida y sencilla.

Finalmente, la fabricación artesanal de las asas por nuestro método ofrece ventajas económicas frente a la importación. El costo de las asas sería aproximadamente la mitad del precio de catálogo de las asas de un fabricante internacional conocido [13], sin tomar en cuenta que la adquisición del producto importado además debe incluir los costos de envío y nacionalización, en cuyo caso el valor de las asas artesanales podría representar cerca de un tercio del costo de sus equivalentes comerciales.

De este estudio entonces se desprende que (1) todas las asas se ven afectadas por el ángulo de carga, (2) ambos grupos de asas (comerciales y artesanales) se desempeñan de forma idéntica, (3) los métodos de calibración gravimétrico y colorimétrico prácticamente se comportan de la misma forma y (4) la fabricación de asas de metal por el método aquí descrito, es una tarea de fácil ejecución y de bajo costo.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Fundacite Aragua y a la Empresa Techomat C.A. por el financiamiento de este trabajo.

### Referencias

1. Albers AC, Fletcher RD. Simple method for quantitation of viable micoplasma, Appl Environ Microbiol. 1982; 43(4):958-60.
2. Burri P. The quantitative smear-culture: a simple means for bacteriological examination of milk World Dairy Congress. 1928
3. Jacobs JA, De Brauwier E, Cornelissen E, Drent M. Accuracy and precision of quantitative calibrated loops in transfer of bronchoalveolar lavage fluid. J Med Microbiol. 2000; 38: 2117-21.
4. Barry AL, Smith P, Turck M. Cumitech 2. Laboratory diagnosis of urinary tract infections. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1975; 28:150-90.
5. Frimodt-Moller N, Espersen F. Evaluation of calibrated 1 and 10 microl loops and dipslide as compared to pipettes for detection of low count bacteriuria in vitro. APMIS. 2000; 30:525-30.
6. Jacobs JA, Stobberingh EE, Drent M, Cornelissen E. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in bronchoalveolar lavage fluid samples by a rapid immunochromatographic membrane assay. J Med Microbiol. 2005; 43:4037-40.
7. Deldari M. Designing a new programme for calibration of bacteriological loops. Clin Microbiol Infect. 2000; 26:903-16.
8. Skoog DA. Principles of Instrumental Analysis. New York: Holt, Rinehart and Winston; 1971.
9. Wong J. Gauge for validating the calibration of a loop. En: <http://www.sciloops.com/cilg.html>. Acceso 26 de septiembre de 2007.
10. Sarvin P, Kamal K, Dinesh S, Joseph D. Effect of surfactant concentration and film area on the stability of films of surfactant solutions. J Colloid Interface Sci. 1996; 32:564-78.
11. Shaw DJ. Colloid and Surface Chemistry. 4ª ed. Gran Bretaña: Butterworth-Heinemann Ltd; 1992.
12. Jaugen J., Strom O, Ostervold A., Bacterial counts in urine. The reliability of the loop technique. Acta Pathol Microbiol Scand. 1968; 74:391-6.
13. Costo de una asa calibrada de níquel-cromo de  $10 \mu\text{L}$  de un conocido fabricante internacional. [https://www.vwrsp.com/catalog/product/index.cgi?catalog\\_number=30002-142&inE=1&highlight=30002-142](https://www.vwrsp.com/catalog/product/index.cgi?catalog_number=30002-142&inE=1&highlight=30002-142). Acceso 14 de mayo 2010.