



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“ESTUDIO ESPORICIDA DE UN DESINFECTANTE Y
ESTERILIZANTE COMERCIAL (ESTERICIDE QX) EN
ESPORAS BACTERIANAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VERONICA FRAUSTO LOTZIN

**ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ.
MVZ. JOSE ANTONIO LICEA VEGA.
MVZ. DAVID PAEZ ESQUILIANO.**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la oportunidad y la fuerza de concluir esta etapa mi vida que es un paso más para mejorar e iniciar un nuevo ciclo.

A mi mamá por todo su apoyo incondicional que siempre me ofrece, a mis hermanas, a cada una de ellas por ese apoyo, que cada una de ustedes me ha ofrecido en particular. GRACIAS

A mis asesores MVZ Gerardo Cruz y MVZ Antonio Licea, por darme ese entusiasmo por realizar las cosas, sus consejos y sobre todo su amistad.

A FES-Cuautitlan por darme la oportunidad de adquirir una formación académica y profesional.

A la empresa Esteripharma S.A. de C.V. por permitirme trabajar con ustedes en este proyecto.

A MI PRINCESITA DANY por iluminar mi vida, llenarme de esperanza y sobre todo ser el principal motivo para superarme.

A mi gran amigo Manuel, gracias por todo el apoyo incondicional que me ofreciste durante esta etapa, no fue fácil, pero ¡POR FIN LO LOGRE!

Te animo a que te intereses por esos dominios sagrados llamados expresivamente laboratorios. Ten en cuenta que son los templos del futuro, la salud y el bienestar. En ellos la humanidad crecerá, se fortalecerá y mejorará. Allí, la humanidad aprenderá a progresar, entendiendo la armonía de la naturaleza, evitando así su tendencia hacia la barbarie, el fanatismo y la destrucción.

Louis Pasteur

INDICE GENERAL

	PAG.
Índice de Tablas.....	I
Índice de Figuras.....	II
Índice de Graficas.....	III
Índice de Diagramas.....	IV
Abreviaturas.....	V
1. Introducción.....	1
Objetivo General.....	9
Objetivos Particulares.....	9
Hipótesis.....	10
Justificación.....	11
2. Materiales.....	12
3. Diagrama de flujo.....	14
4. Metodología	
4.1 Obtención de esporas bacterianas.....	15
4.2 Identificación de esporas bacterianas.....	15
4.2.1 Preparación de medios.....	15
4.2.2 Identificación.....	15
4.3 Ensayo No 1	
4.3.1 Preparación del desinfectante.....	16
4.3.2 Ensayo en microplaca.....	17
4.3.3 Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann.....	18
4.4 Ensayo No 2	
4.4.1 Preparación de la espora bacteriana a diferentes concentraciones...	19
4.4.2 Ensayo en microplaca.....	20
5. Resultados	
5.1 Resultados de la Tinción de Gram.....	22
5.2 Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de las esporas Bacterianas.....	23
5.2.1 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar esporas bacterianas del genero <i>Bacillus</i>	23
5.2.2 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar esporas bacterianas del genero <i>Clostridium</i>	25
5.3 Ensayo No 1	
5.3.1 Resultados para el genero <i>Bacillus</i>	
5.3.1.1 Efecto esporicida/esporiostatico para el genero <i>Bacillus</i>	28
5.3.1.2 Prueba cualitativa con la Técnica de Mosmann.....	31

5.3.2 Resultados para el genero <i>Clostridium</i>	
5.3.2.1 Efecto esporicida/esporiostatico para el genero <i>Clostridium</i>	31
5.3.2.2 Prueba cualitativa con al Técnica de Mosmann.....	33
5.4 Ensayo No2	
5.4.1 Resultados para el genero <i>Bacillus</i>	34
5.4.2 Resultados para el genero <i>Clostridium</i>	35
6. Discusión.....	36
7. Conclusiones.....	44
8. Sugerencias.....	45
9. Referencias.....	46
Glosario	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

	PAG.
1. Niveles de acción de los desinfectantes y actividad experimental.....	4
2. Pruebas de identificación para esporas bacterianas.....	16
3. Resultados de la Tinción de Gram.....	22
4. Resultados de las pruebas bioquímicas para el genero <i>Bacillus</i>	23
5. Resultados de las pruebas bioquímicas para el genero <i>Clostridium</i>	25
6. Estericide Qx a distintas concentraciones con diferentes tiempos de exposición para el genero <i>Clostridium</i>	32

INDICE DE FIGURAS

	PAG.
1. Tinción de Gram para el genero <i>Bacillus</i>	23
2. Tinción de Gram para el genero <i>Clostridium</i>	23
3. Acido de sacarosa.....	24
4. Acido de dextrosa.....	24
5. Acido de manitol.....	24
6. Acido de galactosa.....	24
7. Acido de lactosa.....	24
8. Acido de xilosa.....	24
9. Nitratos.....	25
10. SIM (motilidad).....	25
11. Acido de dextrosa.....	26
12. Acido de lactosa.....	26
13. Acido de sacarosa.....	26
14. Acido de maltosa.....	26
15. SIM (motilidad).....	26
16. Inhibición de crecimiento para el genero <i>Bacillus</i> con un tiempo de exposición de 15 minutos con Estericide Qx.....	28
17. Inhibición de crecimiento para el genero <i>Bacillus</i> con un tiempo de exposición de 30 minutos con Estericide Qx	29
18. Inhibición de crecimiento para el genero <i>Bacillus</i> con un tiempo de exposición de 45 minutos con Estericide Qx	29
19. Inhibición de crecimiento para el genero <i>Bacillus</i> con un tiempo de exposición de 60 minutos con Estericide Qx	30
20. Estericide Qx sin dilución a diferentes tiempos de exposición para el genero <i>Bacillus</i>	30
21. Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann.....	31
22. Estericide Qx sin dilución a diferentes tiempos de exposición para el genero <i>Clostridium</i>	32
23. Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann.....	33

INDICE DE GRAFICAS

	PAG.
1. Diluciones de Estericide Qx contra tiempo para el genero <i>Bacillus</i>	27
2. Estericide Qx sin dilución a los diferentes tiempos para el genero <i>Bacillus</i>	27
3. Estericide Qx sin dilución contra diferentes concentraciones de esporas bacterianas del genero <i>Bacillus</i>	34
4. Estericide Qx sin dilución contra diferentes concentraciones de esporas bacterianas del genero <i>Clostridium</i>	35

INDICE DE DIAGRAMAS

	PAG.
1. Preparación del desinfectante.....	17
2. Rótulos para el ensayo en microplaca.....	17
3. Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann.....	19
4. Preparación de esporas bacterianas a diferentes concentraciones.....	20
5. Rótulos para el ensayo en microplaca.....	20

ABREVIATURAS

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ml mililitros

ul microlitos

gr. gramos

°C grados centígrados

min. minutos

SSFE Solución Salina Fisiológica Estéril

NaCl Cloruro de sodio

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

La prevención y lucha contra las infecciones se remonta a períodos anteriores al descubrimiento de los microorganismos como agentes causales de las enfermedades infecciosas.¹

Hace doscientos cincuenta años Leeuwenhoek, se asomó por vez primera a un mundo nuevo y misterioso poblado por millares de diferentes especies de seres pequeños algunos feroces y mortíferos, otros útiles y benéficos.²

Con los descubrimientos de Pasteur en el siglo pasado, se demostró la causa de numerosas enfermedades contagiosas son los microorganismos que se transmiten utilizando diferentes mecanismos.¹

En 1867, el cirujano británico Joseph Lister utilizó por primera vez el fenol como desinfectante para, vendajes e instrumentos quirúrgicos, asoció el descubrimiento de las bacterias y su participación en la génesis de las infecciones, por lo que introdujo el concepto de asepsia en la práctica quirúrgica y la idea de prevenir la infección mediante los antisépticos, utilizando las nebulizaciones con fenol para desinfectar el aire, el lavado de manos del cirujano y la desinfección de la zona quirúrgica.³

Estas prácticas mejoraron sustancialmente el pronóstico de las intervenciones quirúrgicas, posibilitando a su vez el desarrollo de la cirugía.³

A través de los trabajos de Von Bergmann se crearon las técnicas de esterilización por vapor. Posteriormente, con los descubrimientos de nuevos antisépticos, ha ido mejorando la lucha contra la infección. Todas estas habilidades se han modificado a lo largo de los últimos años.¹

Por otro lado, la antisepsia constituye los pilares de la prevención de una contaminación e infección a nivel hospitalario e industrial.¹

1.2 LIMPIEZA

En la actualidad la industria farmacéutica ha avanzado en un desarrollo sanitario hacia la fabricación de medicamentos de gran calidad. Más y más empresas están introduciendo sistemas mejorados de higiene y limpieza, usando herramientas necesarias para una adecuada limpieza de sus áreas de trabajo, y de esta manera garantizar la calidad de los medicamentos.⁷

Asimismo la industria ha comenzado a darse cuenta de los riesgos de una posible contaminación ocasionada por acumulación de polvo, la entrada y proliferación de microorganismos a las áreas de manufactura y áreas asépticas de la planta.⁷

La operación de manufactura de una planta farmacéutica no solo debe estar diseñada en función de la seguridad sanitaria del producto que se elabora, sino también debe tomar en cuenta la seguridad y bienestar del personal para crear un ambiente adecuado en las labores de limpieza e higiene en las áreas de trabajo.⁷

Es imprescindible contar con un método de trabajo que ayude al personal a tener un sistema correcto de limpieza y desinfección de las áreas y así optimizar los recursos materiales que se tienen, evitando riesgos de trabajo, aumentando la eficiencia de costos e incrementar la productividad.⁷

Cada industria debe tener elaborado y especificado un protocolo general de higiene y limpieza así como desinfección de acuerdo a las recomendaciones oficiales existentes al respecto, que debe contemplar individualmente las circunstancias particulares de algunas áreas críticas.⁴

El proceso de limpieza es una importante actividad en la industria farmacéutica, mantener y alcanzar la calidad de los productos requiere de un programa de limpieza formal y consistente. Por lo que se define como el proceso de separación, por medios mecánicos y/o físicos, de la suciedad de residuos de activo, excipientes, mezcla de ambos o de alguna otra sustancia depositada en las superficies inertes que constituyen un soporte físico y nutritivo de los microorganismos, que puede crear un producto adulterado y contaminación de objetos. El agente básico es el detergente.^{3, 4}

Así mismo cada compañía debe adoptar las estrategias que más le convengan de acuerdo a sus necesidades individuales.³

El término grado de limpieza se aplica en base a la siguiente clasificación:

- Mínima o menor: Es cuando se procesa de manera secuencial el mismo producto.
- Normal o mayor: Cuando se procesan productos diferentes.
- Exhaustiva: Cuando se procesa una limpieza especial, como después de una remodelación o mantenimiento programado o correctivo.

Cronológicamente, la limpieza es un paso previo a la desinfección, por lo que constituye un factor de importancia prioritaria, ya que su ejecución incorrecta o defectuosa planteará múltiples problemas para la realización de posteriores procesos tales como la desinfección o la esterilización.³

Solo aquellas industrias que tienen procesos de limpieza y sanitización bien implementados y aplicados pueden dar confianza sobre la calidad de sus productos.⁴

Para el adecuado funcionamiento de un área de operación es necesario realizar limpieza y desinfecciones periódicas que coadyuven a preservar las condiciones de trabajo adecuadas.⁵

1.3 DESINFECCION

La desinfección va enfocada prioritariamente al ataque y destrucción de los posibles microorganismos y esporas que puedan causar una infección o contaminación.^{5, 8.}

La adecuada desinfección de las áreas debe ser realizada de tal manera que proteja debidamente todas las superficies de trabajo, las superficies externas de los equipos y de todo aquel material de trabajo normal que se encuentre dentro del área.⁵

La desinfección se realizará utilizando por lo general un producto químico que mate las formas vegetativas de los microorganismos, pero no necesariamente las formas resistentes o esporas, son sustancias que se aplican a superficies inanimadas y sobre todo que tengan siempre un poder bactericida demostrado.^{5,8}

Existen tres niveles de desinfección: ³

- De bajo nivel: Se destruyen la mayoría de las formas vegetativas bacterianas, algunos virus y hongos, no esporas bacterianas.
- De nivel intermedio: Se inactivan todas las formas bacterianas vegetativas, la mayoría de los virus y hongos, pero no asegura la destrucción de esporas bacterianas.
- De alto nivel: Se destruyen todos los microorganismos incluyendo esporas.

Tabla No.1 Niveles de acción de los desinfectantes y actividad experimental

Nivel de acción	Bacterias			Hongos ¹	Virus	
	Esporas	Mico bacterias	Células Vegetativas		Pequeños no lipídicos	Medianos o lipídico
Alta	± ²	+	+	+	+	+
Intermedia	- ³	+	+	+	± ⁴	+
Baja	-	-	±	±	±	+

1. Incluye esporas asexuales, o esporas sexuales.
2. Sólo con tiempos de exposición extendidos, los desinfectantes tienen actividad esporicida en los laboratorios.
3. Algunos desinfectantes de acción intermedia (fenoles) pueden tener alguna actividad esporicida, otros (alcoholes) no la han demostrado.
4. Algunos desinfectantes intermedios (yodóforos, aldehídos), pueden tener actividad antivírica limitada.

Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencias al ataque de estos agentes químicos, es recomendable el ciclado o el rolar a estos mismos.⁵

Este ciclado usará alternadamente agentes químicos que utilicen radicales químicos distintos para ejercer su acción, ya que esto dificulta la aparición de microorganismos resistentes.⁵

Es necesario llevar una bitácora que documente tanto el ciclado de los agentes desinfectantes como la periodicidad con que se realiza este procedimiento. Este registro será útil en la detección de las fuentes de contaminación de los microorganismos que se puedan encontrar con mayor frecuencia.⁵

Muchos de los agentes químicos comunes (desinfectantes) se presentan en forma líquida, por lo que se pueden aplicar por vaporización o por frotamiento.⁵

Si éste es el caso, se tendrá especial cuidado que las telas con que éstos se aplican no liberen partículas que puedan contaminar el medio ambiente.⁵

La limpieza y la desinfección, constituyen, junto con la esterilización, los elementos primarios y más eficaces para evitar contaminaciones en la industria farmacéutica y garantizar la calidad de sus productos.³

Se considera como medio séptico cuando existen microorganismos, mientras que el medio será aséptico cuando está exento de ellos.³

Cuando el medio séptico quiere transformarse en aséptico, se precisa realizar una desinfección.³

Si se quiere obtener un determinado medio exento de microorganismos patógenos, se podría conseguir de dos formas diferentes. Una adoptando medidas que impidan la llegada de éstos hasta ese medio. La segunda consistirá en la eliminación de los microorganismos patógenos presentes.³

Bajo el concepto de asepsia se entiende a una serie de procedimientos dirigidos a impedir la llegada de microorganismos a un medio aséptico, trata de prevenir la contaminación.³

Entre las medidas generales de asepsia que se utilizan se pueden citar algunas como: limpieza; indumentaria adecuada; cámaras de flujo laminar; desinfección; formación sanitaria del personal.³

La antisepsia se entiende como acciones que conducen a la eliminación de los microorganismos presentes en un área.³

Para conseguir estos fines se utilizan los desinfectantes, bactericidas de mayor toxicidad, que se emplean para objetos, ambiente y superficies.³

Los desinfectantes más utilizados en la actualidad se clasifican de la siguiente manera:⁸

- Agentes químicos:
- Fenol y compuestos fenólicos
 - Aldehídos
 - Halógenos
 - Colorantes

- Metales pesados y sus compuestos
- Agentes tensoactivos
- Ácidos y álcalis
- Agentes oxidantes
- Gases desinfectantes
- Alcoholes

Los principales mecanismos de acción de los desinfectantes son:⁹

- La desnaturalización de proteína
- Alteración de la membrana celular (permeabilidad, alteraciones enzimáticas)
- Oxidación celular.

TIPOS DE DESINFECTANTES:¹⁰

Se clasifican de acuerdo con su mecanismo de acción:

A) AGENTES QUE DAÑAN LA MEMBRANA

1) Agentes tensoactivos

a) catiónicos

b) aniónicos

c) no iónicos

2) Compuestos fenólicos

a) fenol

- b) cresoles
- c) di-fenilos halogenados
- d) alquilésteres del p-hidroxibenzoico
- e) aceites esenciales de plantas

3) Alcoholes

- a) etanol
- b) isopropanol

B) AGENTES DESNATURALIZANTES DE PROTEINAS

- 1) Ácidos y bases fuertes
- 2) Ácidos orgánicos no disociables

C) AGENTES MODIFICADORES DE GRUPOS FUNCIONALES

1) Metales pesados

- a) mercuriales
- b) compuestos de plata
- c) compuestos de cobre

2) Agentes oxidantes

- a) halógenos
- b) agua oxigenada
- c) permanganato potásico
- d) ácido peracético

3) Colorantes

- a) derivados de la anilina
- b) derivados de la acridina (flavinas)

4) Gases

- a) formaldehído
- b) glutaraldehído
- c) óxido de etileno
- d) β -propionil-lactona

1.4 CARACTERISTICAS DE UN BUEN DESINFECTANTE

1. No tóxico: Debe poseer un espectro de actividad amplio y a bajas concentraciones.
2. Solubilidad: Debe ser soluble en agua.
3. Inocuidad: No debe ser tóxico para los animales, o equipos de trabajo donde se aplique.
4. Estabilidad: No debe perder su actividad bactericida durante almacenamientos prolongados.
5. Homogeneidad: La preparación debe tener composición uniforme.
6. Activo a temperatura ambiente.
7. Poca afinidad por la materia orgánica. Algunos desinfectantes tienen afinidad por la materia orgánica, de manera que al combinarse con ella reduce su efectividad para actuar contra los microorganismos.
8. No debe ser corrosivo ni debe manchar donde se aplique.
9. Capacidad de penetración. Si no penetra puede quedar reducida su actividad sólo en la superficie sobre la que se aplica.
10. Desodorante y detergente.
11. Económico y de fácil adquisición.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar el efecto esporicida de un desinfectante y esterilizante comercial (Estericide Qx) utilizando el método de Mosmann para disminuir al mínimo la posibilidad de contaminación microbiana en áreas críticas de trabajo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto esporicida/esporiostático de Estericide Qx por medio de la técnica de Mosmann.
- Comprobar el efecto esporicida de Estericide Qx a diferentes tiempos de exposición.
- Verificar con diferentes concentraciones de esporas el efecto esporicida de Estericide Qx.
- Confirmar el efecto esporicida de Estericide Qx usando diferentes concentraciones del mismo.

HIPOTESIS

Si Estericide Qx es un desinfectante y esterilizante, entonces podrá actuar como un esporicida bacteriano y contar con una alternativa más para evitar contaminaciones en áreas críticas de trabajo en la Industria Farmacéutica y Hospitales.

JUSTIFICACION

Las esporas bacterianas son formas de perdurabilidad de ciertos grupos de bacterias frente al calor, la desecación, la radiación y las influencias químicas, la termorresistencia es una de sus principales características.¹⁷

Para la industria farmacéutica y los hospitales a sido motivo de preocupación la contaminación de áreas críticas en la fabricación de inyectables, así como en personas hospitalizadas las infecciones de heridas quirúrgicas por microorganismos. Los desinfectantes con capacidad esterilizante juegan un papel determinante en la cantidad de bacterias que abundan en quirófanos y áreas de producción de inyectables.¹³

De acuerdo al trabajo con el desinfectante comercial (Estericide Qx) y su efecto esporicida/esporiostático está diseñada para la desinfección de superficies de alto riesgo (quirófanos, salas de urgencias, salas de curación, la industria alimentaria) y respaldando su aceptación en la Industria farmacéutica.¹⁴

El presente trabajo de tesis sobre el efecto esporicida del esterilizante y desinfectante comercial (Estericide Qx) en esporas bacterianas se efectúa a solicitud del Laboratorio Fabricante del producto (Esteripharma S.A. de C.V.) por innovación del producto y lanzamiento al mercado comprobando su efectividad como una solución desinfectante de alto nivel de súper-oxidación con un pH neutro.

2. MATERIALES

MATERIAL

- Cajas petri de vidrio estériles de 9X15 cm. (Pyrex)
- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13X100 (Pyrex)
- Pipetas volumétricas 10ml (Kimax)
- Pipetas volumétricas 5ml (Kimax)
- Gradillas para tubos
- Micro pipeta ajustable (Oxford)
- Puntas amarillas para micro pipeta
- Asa bacteriológica
- Frascos lecheros con tapa de baquelita (Kimax)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Matraz Erlenmeyer de 500ml (Kimax)
- Matraz Erlenmeyer de 250ml (Kimax)
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml (Kimax)
- Probeta graduada 500ml (Oxford)
- Palillos estériles
- Mechero de Bunsen
- Micro placa estéril (Sarstedt)
- Jarra Gaspak (BBL- Gaspak System)
- Espátula
- Soporte Universal

EQUIPO

- Autoclave de vapor (tipo vertical) sin marca
- Refrigerador (Acros)
- Estufa bacteriológica (Riossa)
- Microscopio óptico (Olympus)
- Parrilla con agitador (Sybron Thermolyne)
- Balanza granataria (Ohaus)
- Agitador Vortex (Genie 2 Scientific Industries-G560)

MEDIOS DE CULTIVO

- Medio BHI agar (Dibico)
- Medio Anaeróbico agar (Bioxon)
- Caldo Peptonado (Agua Peptonada) (Dibico)
- Medio Cooket Meat (Bioxon)
- Agar Gelatina nutritiva (Bioxon)
- Agar dextrosa (Bioxon)
- Base de agar urea de Christensen (Dibico)
- Medio de Nitratos (Dibico)
- Medio de SIM (Merck)
- Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey)

REACTIVOS

- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Tren para Tinción de Gram
- Peróxido de hidrogeno al 30%
- MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (SIGMA M-2128)

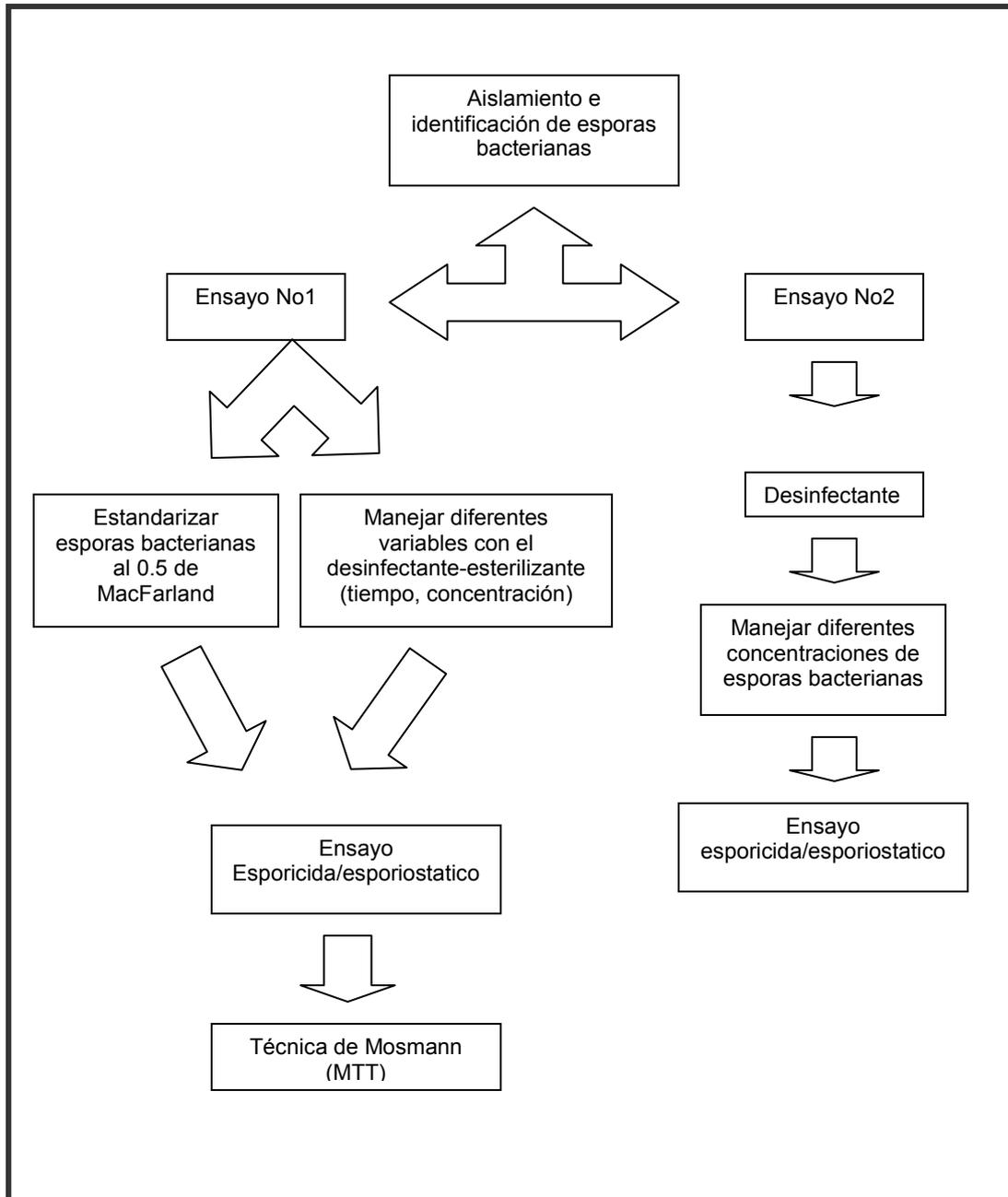
MATERIAL BIOLÓGICO

- Esporas bacterianas
7 esporas bacterianas, contenidas en agua destilada estéril.
Identificadas con el siguiente número: 1, 2, 3, 4, 5, 6,7
- Muestra de heces (caballo y vaca)
- *Bacillus subtilis*

PRODUCTO QUIMICO

- Estericide Qx Desinfectante y Esterilizante. (Esteripharma)

1. DIAGRAMA DE FLUJO



4. METODOLOGIA

4.1 OBTENCION DE ESPORAS BACTERIANAS

- Esporas bacterianas, contenidas en agua destilada estéril, cuyas muestras se encontraban en el Laboratorio No. 10 de Microbiología de Posgrado.
Identificadas de la siguiente manera: 1, 2, 3, 4, 5, 6,7
- Muestra de heces (caballo y vaca).Obtenidas de FES-CUAUTITLAN (C-4).
- *Bacillus subtilis*. Pertenece al cepario del Laboratorio No. 10 de Microbiología de Posgrado.

4.2 IDENTIFICACION DE ESPORAS BACTERIANAS

4.2.1 PREPARACION DE MEDIOS (Anexo 1)

- BHI en placa.
- Medio Anaeróbico en placa.
- Medio Cooket Meat en tubos de ensayo con tapón de rosca.

4.2.2 IDENTIFICACION

- Las 7 esporas bacterianas se sembraron en medio BHI en placa (condiciones aeróbicas) y medio Anaeróbico en placa (condiciones anaeróbicas) se incubaron a 37°C por 18-24 hrs.
- Cada una de las muestra de heces se sembraron en medio Cooket Meat, los tubos con las muestras se pusieron a hervir a temperatura de ebullición (96°C) por 5 minutos, se incubaron a 37°C por 24 hrs. Después del periodo de incubación se sembraron en medio de BHI en placa (condiciones aeróbicas) y en medio Anaeróbico en placa (condiciones anaeróbicas) incubándose a 37°C durante 24 hrs.
- Pasado del tiempo de incubación de todas las muestras y observar; se sembraron cada una de ellas en medio BHI en placa (condiciones aeróbicas) y en medio Anaeróbico en placa (condiciones anaeróbicas) y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. Con el propósito de obtener muestras puras.
- Se realizaron pruebas bioquímicas a cada una de las bacterias para su identificación.(Tabla No 2)

Tabla No.2

Pruebas de identificación para Esporas Bacterianas

<i>Bacillus spp</i>	<i>Clostridium spp</i>
Tinción de Gram	Tinción de Gram
SIM (motilidad)	SIM (Motilidad)
Nitratos	Acido de Dextrosa
Gelatina	Acido de Lactosa
Acido de Dextrosa	Acido de Sacarosa
Acido de Xilosa	Acido de Maltosa
Acido de Manitol	Catalasa
Acido de Sacarosa	Gelatina
Acido de Galactosa	Crecimiento en Agar Anaeróbico
Acido de Lactosa	
Catalasa	

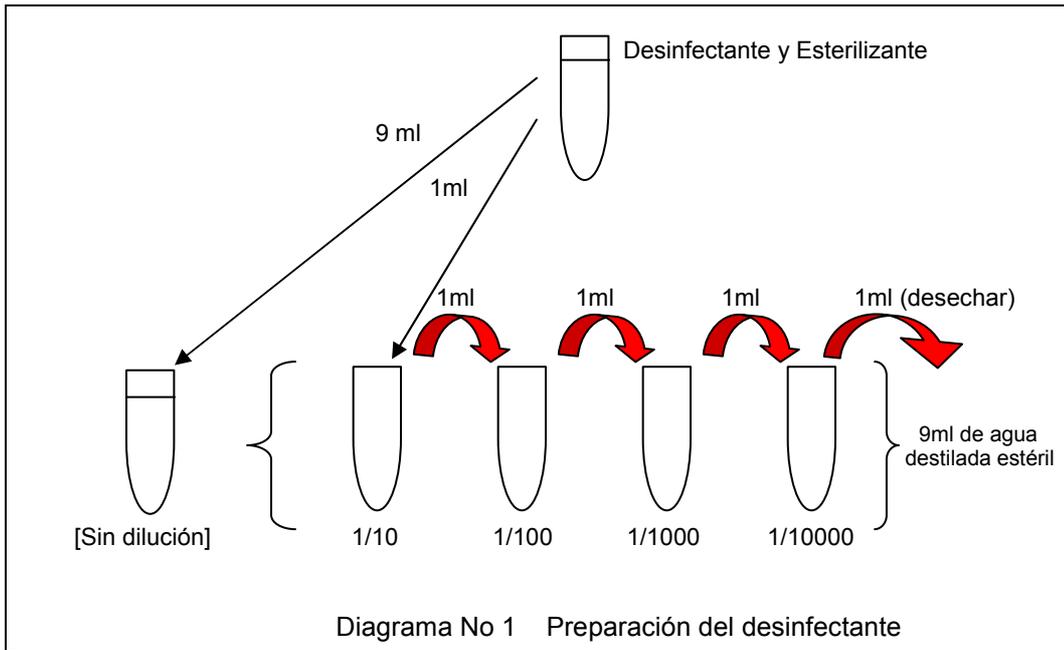
- Se sometieron a esporular las bacterias, tomando varias asadas de cada una de las bacterias y se sembró en 4 ml de agua destilada estéril en tubos con tapón de rosca, dejando a temperatura ambiente por 72 hrs.
- Las esporas bacterianas se mantuvieron en agua destilada estéril en tubo con tapón de rosca para todos los ensayos con el desinfectante y esterilizante Estericide Qx.

4.3 ENSAYO No 1

- Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado.
- En este ensayo se manejaron dos variables :
 - ◆ Tiempo
 - ◆ Concentración del desinfectante-esterilizante

4.3.1 PREPARACION DEL DESINFECTANTE-ESTERILIZANTE

- Se realizaron diluciones decimales del desinfectante-esterilizante, se rotularon 5 tubos con tapón de rosca estériles; [sin dilución] 1/10 1/100 1/1000 1/10000, con ayuda de una pipeta graduada se agregaron 9 ml de agua destilada estéril al tubo con la dilución 1/10 hasta la dilución 1/10000, después al primer tubo[sin dilución] se adicionaron 9ml del desinfectante y 1 ml al tubo con la dilución 1/10 se mezcló con vortex y se procedió a realizar las diluciones consecutivas.(ver diagrama No.1)



4.3.2 ENSAYO EN MICROPLACA

- Se debe mencionar que el proveedor del desinfectante-esterilizante (Estericide Qx) hace referencia que el producto actúa a los 15min después de su aplicación. En este caso se trabajó a los 15, 30,45 y 60 min.
- Se rotula una microplaca estéril quedando de la siguiente manera:

Tiempo (min.)

	1	2	3	4
	15min	30min	45min	60min
A	[Sin dilución]	[Sin dilución]	[Sin dilución]	[Sin dilución]
B	1/10	1/10	1/10	1/10
C	1/100	1/100	1/100	1/100
D	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
E	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
F	C(+)	C(+)	C(+)	C(+)
G	C(-)	C(-)	C(-)	C(-)

} Concentración del Desinfectante-esterilizante

Diagrama No2 Rótulos para el ensayo en microplaca

- Estandarizar las esporas bacterianas con ayuda de la escala de Mac Farland empleando el tubo 0.5 utilizando agua destilada estéril.
- Con una micropipeta ajustable de 100ul y puntas estériles se realizó el llenado de los pozos con el Estericide Qx en el siguiente orden:

100ul del tubo [sin dilución]		en el pozo A1
100ul del tubo	1/10	en el pozo B1
100ul del tubo	1/100	en el pozo C1
100ul del tubo	1/1000	en el pozo D1
100ul del tubo	1/10000	en el pozo E1

- Posteriormente se agrego a cada pozo 100ul de las esporas bacterianas estandarizadas.
- Control (+) 100ul agua destilada + 100ul espora bacteriana estandarizada en el pozo F1
Control (-) 100ul agua destilada + 100ul desinfectante-esterilizante en el pozo G1
- Se dejo actuar el desinfectante-esterilizante con las esporas bacterianas por un tiempo de 15min.
- Se detuvo la reacción adicionando a cada pozo 100ul de Agua Peptonada de doble concentración incluyendo al Control (+) y Control (-).
- Todo lo anterior se realiza consecutivamente a los 30,45 y 60 minutos.
- Por ultimo en condiciones de esterilidad se tomo una asada de cada uno de los pozos y se inoculo en tubos con medio BHI (condiciones aeróbicas) y en tubos con medio Anaeróbico (condiciones anaeróbicas) incubándose a 37°C por 18-24 hrs.
- Después de 24 horas de incubación se observaron los tubos y se realizaron lecturas visuales.

4.3.3 PRUEBA CUALITATIVA CON LA TECNICA DE MOSMANN

- Trabajar con los tubos [Sin dilución] de los diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60min), agregar 1ml de solución salina fisiológica estéril a cada tubo y homogenizar, realizar lo mismo en el Control (+) y el Control (-).
- En una microplaca estéril utilizando la micropipeta ajustable se adiciono a cada pozo 100ul de cada uno de los tubos [Sin dilución] de los diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60min), después se agrego a todos los pozos 5ul del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) el cual presenta un color amarillo, se mezclo e incubo en la estufa bacteriológica a 37°C por 3 hrs.
Esta técnica nos permite observar y determinar fácilmente que pozos de la microplaca presentan crecimiento y en que pozos este se ha inhibido por acción del desinfectante. Si no hay presencia de bacterias viables en el pozo el reactivo de MTT permanecerá de color amarillo (oxidado), mientras que si hay bacterias viables el MTT va a virar a color violeta/morado (reducido).
- Al cabo de este tiempo se realizan las lecturas visuales comparando con el Control (+) y el Control (-). (Ver diagrama No.3)

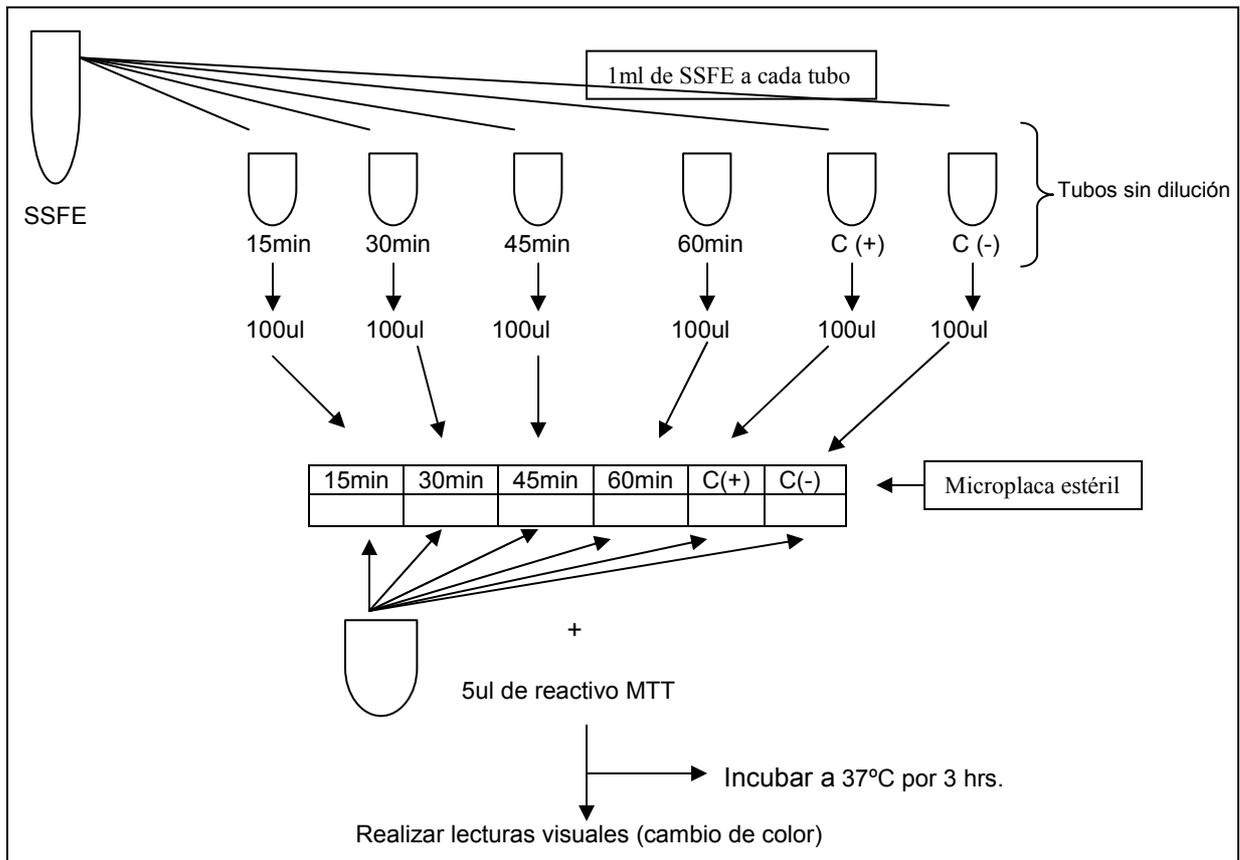


Diagrama No3 Prueba cualitativa con la Técnica de Mosmann

4.4 ENSAYO No 2

- Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado.
- En este segundo estudio la variable que se manipuló fue:
 - ◆ Utilizar diferentes concentraciones de la espora bacteriana en base a la escala de Mac Farland

4.4.1 PREPARACION DE LA ESPORA BACTERIANA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

- Rotular 4 tubos con tapón de rosca estériles con las siguientes concentraciones, 1.0, 0.5, 0.25, 0.12.
- Se adiciona 1 ml de agua destilada estéril al tubo con la concentración de 0.5 hasta el tubo con la concentración de 0.12.
- Con ayuda de la escala de Mac Farland de 1.0 estandarizar las esporas bacterianas utilizando agua destilada estéril.

- De las esporas bacterianas estandarizadas se tomaron 2ml y se adicionaron al tubo con la concentración de 1.0, se mezclo con vortex, de este tubo se tomo 1ml y se adicionaron al tubo con la concentración de 0.5 se mezclo, y se realizaron las diluciones consecutivas.(ver diagrama No 4)

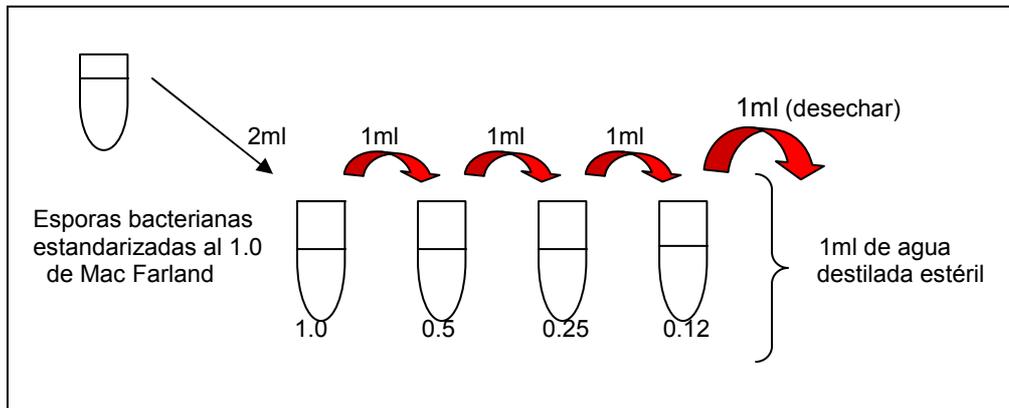


Diagrama No 4 Preparación de Espora bacteriana a diferentes concentraciones.

4.4.2 ENSAYO EN MICROPLACA

- El desinfectante se trabajo como lo indica las especificaciones del proveedor
- Se rotula una microplaca estéril de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6
A	1.0	0.5	0.25	0.12	C(+)	C(-)
B						

Diagrama No5 Rótulos para el ensayo en microplaca

- Con una micropipeta ajustable utilizando puntas estériles se llenan los pozos en el siguiente orden:

100ul del tubo con concentración 1.0 al pozo A1
 100ul del tubo con concentración 0.5 al pozo A2
 100ul del tubo con concentración 0.25 al pozo A3
 100ul del tubo con concentración 0.12 al pozo A4

- Posteriormente se agrego a cada pozo 100ul del desinfectante.
- Control (+) 100ul agua destilada + 100ul espora bacteriana estandarizada en el pozo A5
Control (-) 100ul agua destilada + 100ul desinfectante en el pozo A6
- Se dejo actuar el desinfectante con la espora bacteriana por un tiempo de 15min.
- Detener la reacción adicionando a cada pozo 100ul de Agua Peptonada de doble concentración incluyendo al Control (+) y Control (-).
- Por ultimo en condiciones de esterilidad se tomo una asada de cada uno de los pozos y se inoculo en tubos con medio BHI (condiciones aeróbicas) y en tubos con medio Anaeróbico (condiciones anaeróbicas) incubándose a 37°C por 18-24 hrs.
- Después de 24 horas de incubación se observan los tubos y se realizan lecturas visuales.

NOTA:

***Condiciones Aeróbicas:**

Esto nos indica que los medios que fueron sembrados se incubaron en la estufa bacteriológica en condiciones normales de 37°C por 18-24 hrs. Este tipo de condiciones nos sirve para identificar bacterias aeróbicas.

***Condiciones Anaeróbicas:**

El medio que se empleo fue medio Anaeróbico el cual se incubo en microaerobiosis a 37°C por 18-24 hrs. Esta atmósfera microaerofílica puede crearse con sobres de CO₂ y N₂ como el CampyPak o con el sobre empleado para anaerobiosis, también puede lograrse incubando las placas con medio en una incubadora con una atmósfera de CO₂ del 10 al 15%. Sin embargo existe un método sencillo y económico con el cual se trabajo, que consistió en colocar los medio sembrados en una jarra Gaspak o en un frasco de vidrio de boca ancha, creando la atmósfera con una vela encendida y una tableta efervescente de antiácido tipo Alka-Selter® el cual se coloco en un frasco pequeño de gerber con 3ml de agua.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE LA TINCION DE GRAM

En el aislamiento e identificación de las esporas bacterias se obtuvieron 13 cepas a las cuales se le realizaron a cada una Tinción de Gram dando como resultado lo siguiente:

BACTERIA		MORFOLOGIA MICROSCOPICA
1	1a	Bacilos anchos, aislados, Gram (+) genero <i>Clostridium</i>
	1b	Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram (-), genero <i>Bacillus</i>
2	2a	Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(+), genero <i>Bacillus</i>
	2b	Bacilos anchos cortos, agrupados en pares, Gram (+), genero <i>Clostridium</i> (subterminal)
3	3a	Bacilos anchos, aislados, Gram (+), genero <i>Clostridium</i>
	3b	Bacilos anchos cortos, aislados Gram (+), genero <i>Clostridium</i>
4	4b	Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(-), genero <i>Bacillus</i>
5		Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(-), genero <i>Bacillus</i>
6		Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(-), genero <i>Bacillus</i>
7	b	Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(+), genero <i>Bacillus</i>
Vaca		Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(+), genero <i>Bacillus</i>
Caballo		Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram(-), genero <i>Bacillus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>		Bacilos delgados y largos, agrupados en cadena, Gram (-), genero <i>Bacillus</i>

Tabla No3 Resultados de la Tinción de Gram.
(Ver Fig. 1y 2)

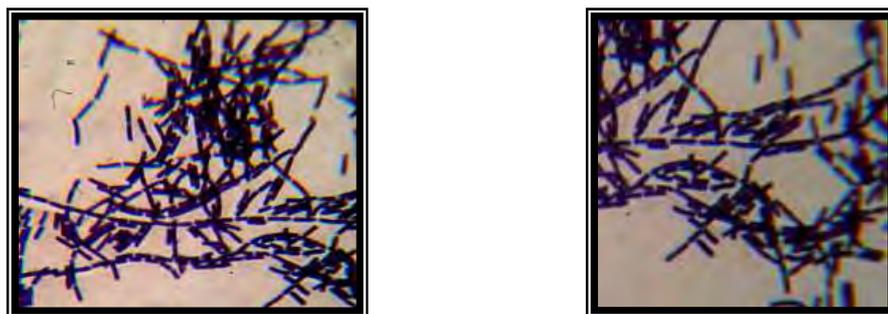


Figura No.1 Tinción de Gram para el genero *Bacillus*

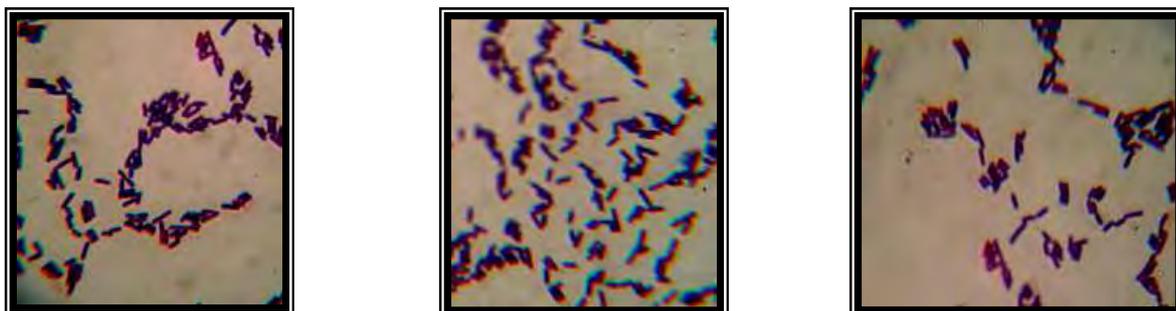


Figura No.2 Tinción de Gram para el genero *Clostridium*

5.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS ESPORAS BACTERIANAS.

5.2.1 PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAR ESPORAS BACTERIANAS DEL GENERO *BACILLUS*.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO
Catalasa	Positivo
SIM (Motilidad)	Positivo
Gota suspendida	Positivo
Nitratos	Positivo
Gelatina	Positivo
Acido de Dextrosa	Positivo
Acido de Xilosa	Positivo
Acido de Manitol	Positivo
Acido de Sacarosa	Positivo
Acido de Galactosa	Positivo
Acido de Lactosa	Negativo

Tabla No 4 Resultados de Pruebas Bioquímicas para el genero *Bacillus* (Ver Fig. 3-10)

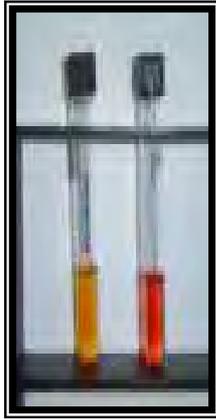


Fig.3 Acido de Sacarosa
Color amarillo- prueba positiva

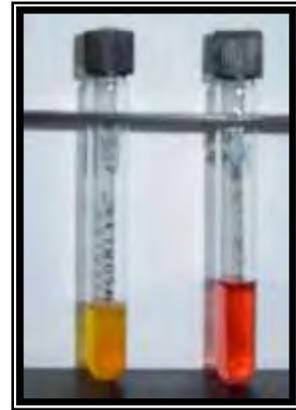


Fig. 4 Acido de Dextrosa
color amarillo-prueba positiva

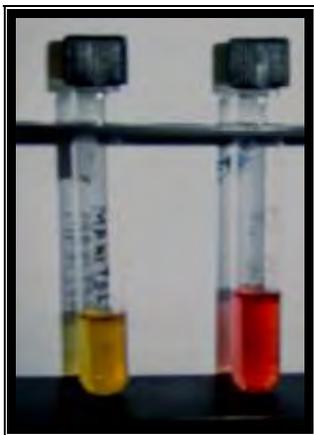


Fig. 5 Acido de Manitol
Color amarillo-prueba positiva

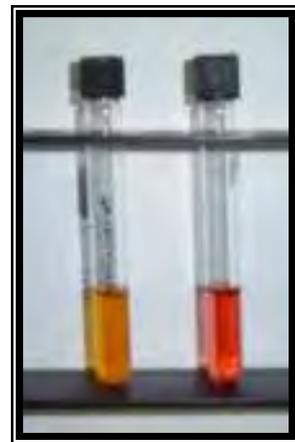


Fig. 6 Acido de Galactosa
color amarillo-prueba positiva

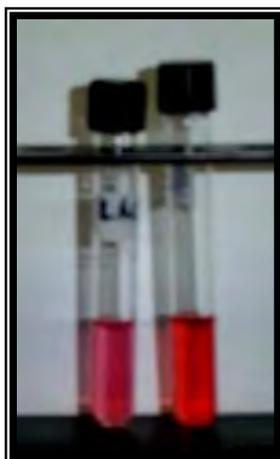


Fig.7 Acido de Lactosa
Color rosa-prueba negativa

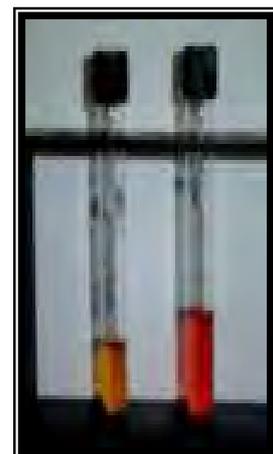


Fig. 8 Acido de Xilosa
color amarillo-prueba positiva

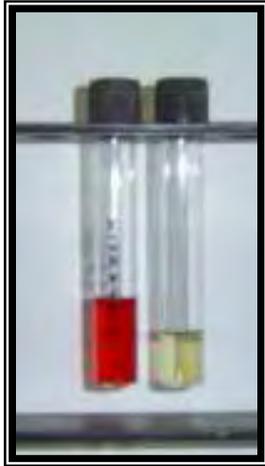


Fig. 9 Nitratos
Color rojo-prueba positiva



Fig. 10 SIM (Motilidad)
prueba positiva-crecimiento en estrías vellosas

5.2.2 PRUEBAS BIQUIMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAR ESPORAS BACTERIAS DEL GENERO *CLOSTRIDIUM*.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADOS
Catalasa	Negativo
SIM (Motilidad)	Positivo
Acido de Dextrosa	Positivo
Acido de Lactosa	Positivo
Acido de Sacarosa	Positivo
Acido de Maltosa	Positivo

Tabla No 5 Resultados de Pruebas Bioquímicas para el genero *Clostridium* (Ver Fig. 11-15.)

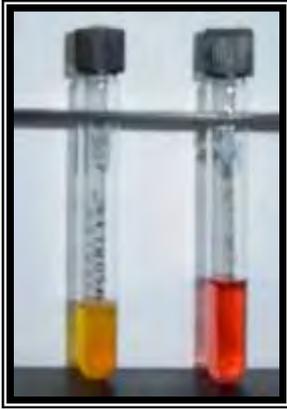


Fig.11 Acido de Dextrosa
color amarillo-prueba positiva

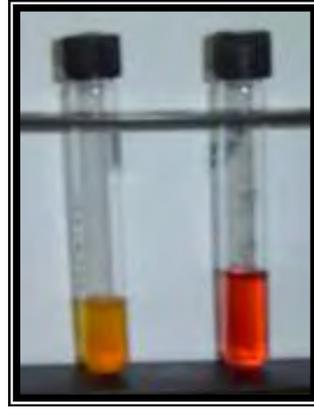


Fig.12 Acido de Lactosa
color amarillo-prueba positiva



Fig.13 Acido de Sacarosa
Color amarillo-prueba positiva

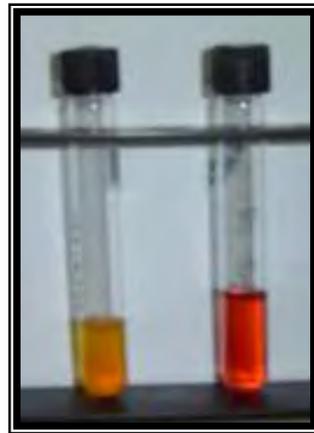


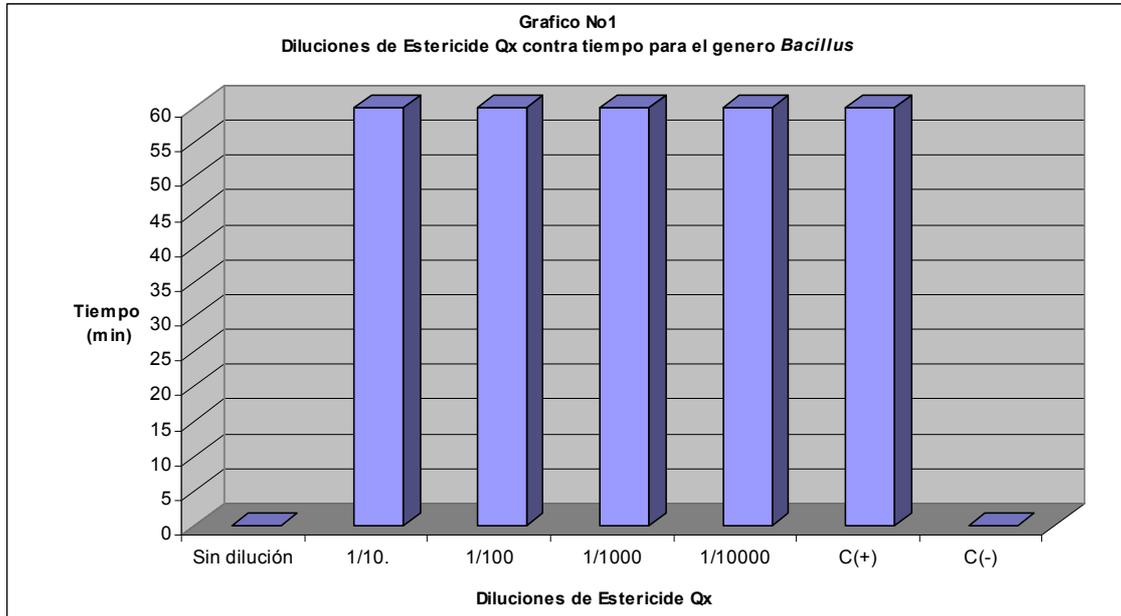
Fig.14 Acido de Maltosa
color amarillo-prueba positiva



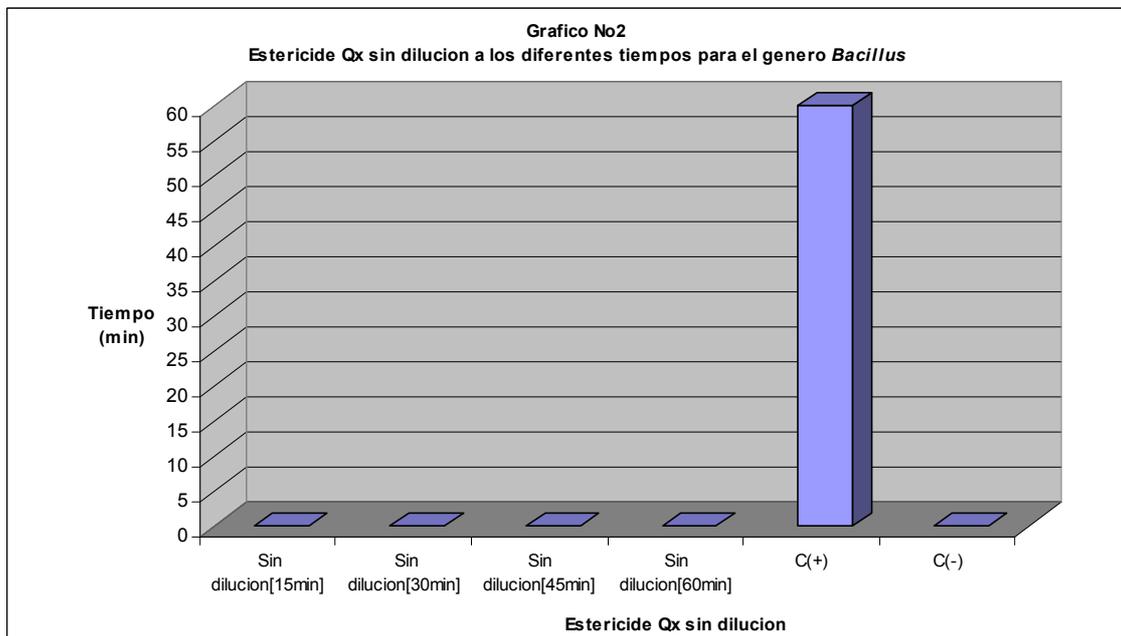
Fig. 15 SIM (Motilidad)
Prueba positiva-crecimiento en estrias vellosas

5.3 ENSAYO No 1

5.3.1 RESULTADOS PARA EL GENERO *BACILLUS*



En el grafico 1 se observa el comportamiento de Estericide Qx a las diferentes concentraciones



En el grafico 2 se puede observar el comportamiento del desinfectante sin dilución a los diferentes tiempos de exposición.

5.3.1.1 RESULTADOS DEL EFECTO ESPORICIDA/ESPORIOSTATICO DEL ESTERICIDE Qx PARA EL GENERO *BACILLUS*.

Para determinar el efecto esporicida/esporiostático del desinfectante-esterilizante el cual se evaluó su efecto sobre esporas bacterianas del género *Bacillus*, a diferentes tiempos y distintas diluciones de Estericide Qx en el cual se observó lo siguiente;

En un tiempo de 15 minutos de exposición de Estericide Qx se observa una inhibición de crecimiento en el tubo sin dilución, y en las diluciones realizadas se observa crecimiento bacteriano comparando con el control (+) y control (-). (Ver Fig. 16)

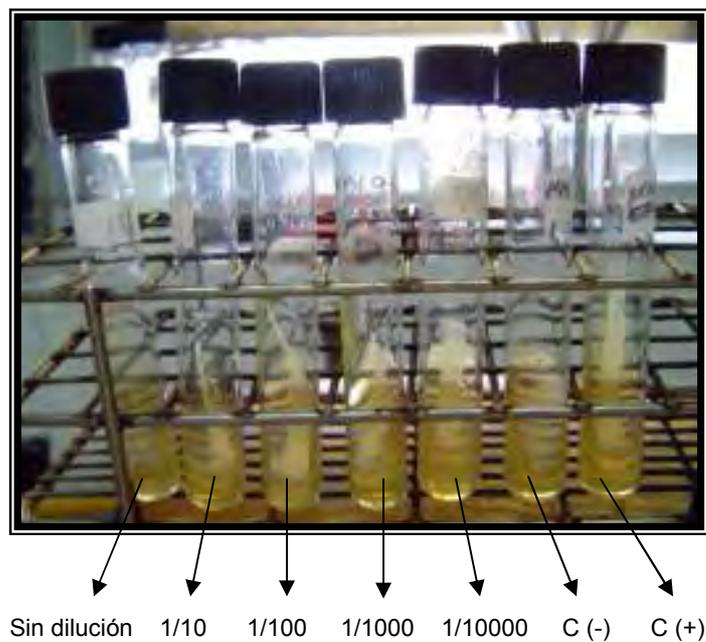


Fig.16 Inhibición de crecimiento para el género *Bacillus* con un tiempo de exposición de 15 min. con Estericide Qx.

Para el tiempo de exposición de 30 minutos también se observa una inhibición de crecimiento en el tubo sin dilución y en las diluciones del Estericide Qx si existe crecimiento bacteriano, comparando con el control (+) y control (-). (Ver Fig. 17)

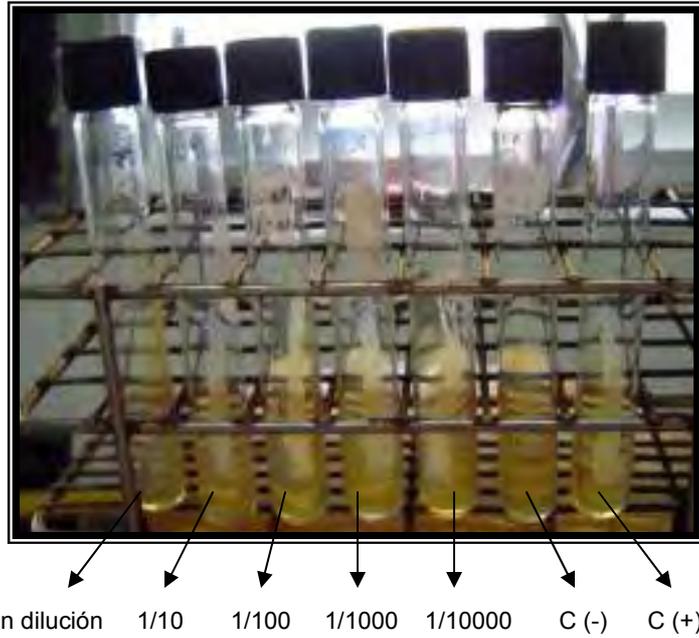


Fig.17 Inhibición de crecimiento para el genero *Bacillus* con un tiempo de exposición de 30 min. con Estericide Qx.

Por ultimo para el tiempo de exposición de 45 y 60 minutos se observa una inhibición de crecimiento en el tubo sin dilución y en las diluciones del Estericide Qx si existe crecimiento bacteriano, comparando con el control (+) y control (-). (Ver Fig. 18 y 19).

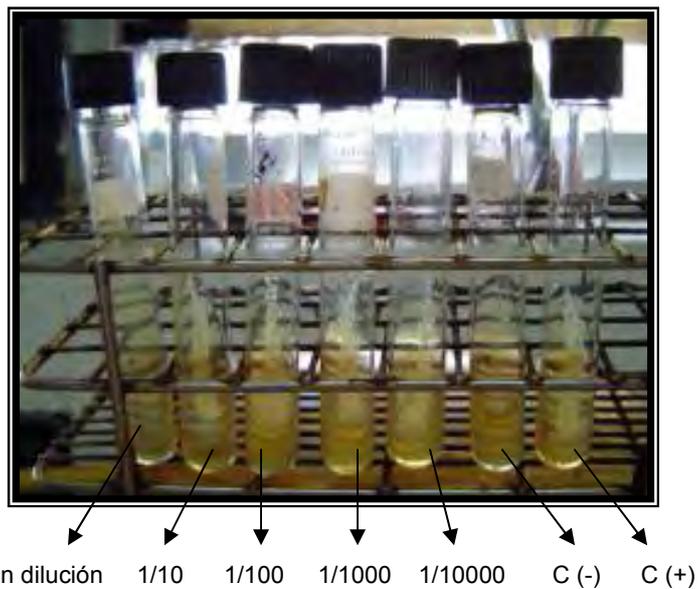


Fig.18 Inhibición de crecimiento para el genero *Bacillus* con un tiempo de exposición de 45 min. con Estericide Qx.

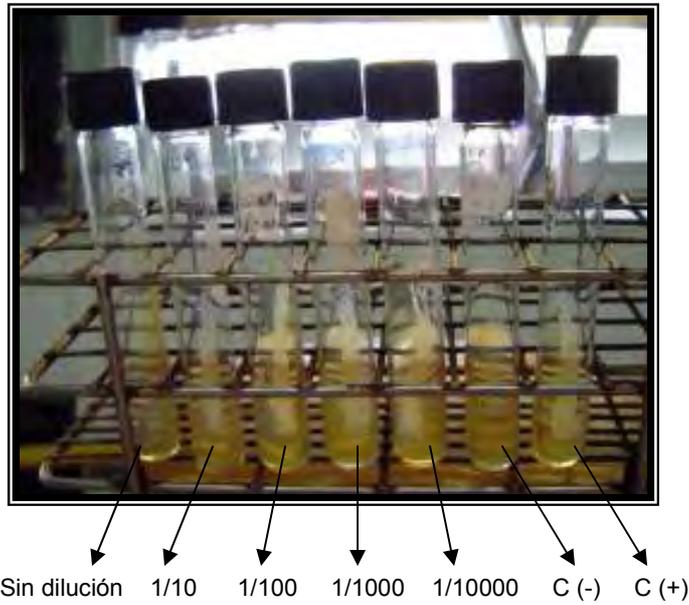


Fig.19 Inhibición de crecimiento para el genero *Bacillus* con un tiempo de exposición de 60 min. con Estericide Qx.

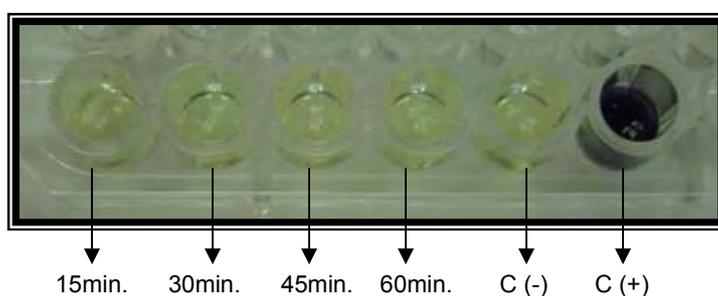
Como se puede observar el desinfectante-esterilizante (Estericide Qx) presenta una inhibición de crecimiento solamente sin dilución. (Ver Fig.20)



Fig. 20 Estericide Qx sin dilución a diferentes tiempos de exposición para el genero *Bacillus*

5.3.1.2 PRUEBA CUALITATIVA CON LA TECNICA DE MOSMANN PARA EL GENERO *BACILLUS*

Se realizo el ensayo por el método de Mossman, utilizando únicamente las muestra sin dilución, a los diferentes tiempos de exposición, evidenciado dicha prueba con el reactivo de MTT, esta técnica permite observar que la forma reducida cambia de color morado púrpura, por acción de la enzima deshidrogenasa, la cual indica presencia de esporas bacterianas viables, y al permanecer su color amarillo (oxidado), indica que no hay presencia de esporas bacterianas viables. (Ver Fig.21)



Desinfectante-esterilizante (Estericide Qx) sin dilución

Fig. 21 Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann

5.3.2 RESULTADOS PARA EL GENERO *CLOSTRIDIUM*

5.3.2.1 EFECTO ESPORICIDA/ESPORIOSTATICO PARA EL GENERO *CLOSTRIDIUM*.

Al evaluar el efecto esporicida/esporiostático de Estericide Qx sin dilución se observa que al tiempo 15, 30 y 45 minutos existe crecimiento de esporas bacterianas, a los 60 minutos se observa un efecto esporiostático, en las diluciones realizadas de Estericide Qx existe crecimiento de esporas bacterianas. (Ver tabla 6) (Ver Fig. 22)

DESINFECTANTE (Estericide Qx)								
T I E M P O		Sin dilución	1/1 0	1/100	1/1000	1/10000	C(+)	C(-)
	15 min.	++++	++ +	+++	+++	+++	++++	-
	30 min.	+++	++ +	+++	+++	+++	++++	-
	45 min.	+	++ +	+++	+++	+++	++++	-
	60 min.	+	++ +	+++	+++	+++	++++	-

(++++) Crecimiento abundante; (+++) Crecimiento moderado
 (+) Poco crecimiento; (-) Inhibición de crecimiento

Tabla No 6 Estericide Qx a distintas concentraciones con diferentes tiempos de exposición para el genero *Clostridium*.

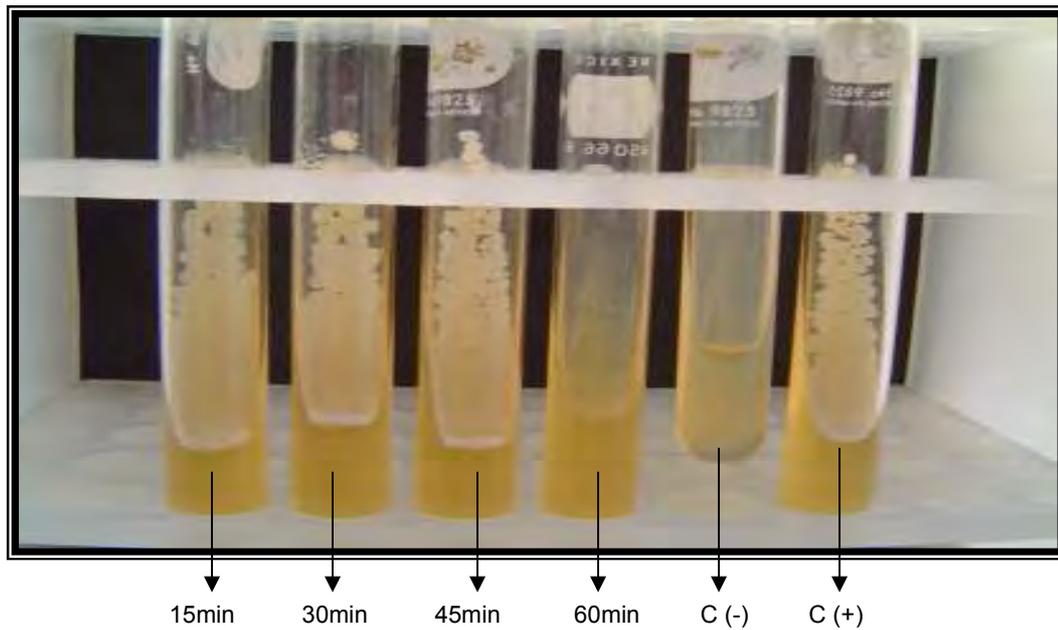


Fig.22 Estericide Qx sin dilución a diferentes tiempos de exposición para el genero *Clostridium*.

5.3.2.2 PRUEBA CUALITATIVA CON LA TECNICA DE MOSMANN PARA EL GENERO *CLOSTRIDIUM*.

Se realizo el ensayo por el método de Mossman, utilizando las muestra sin dilución, a los diferentes tiempos de exposición, evidenciado dicha prueba con el reactivo de MTT, esta técnica permite observar que la forma reducida cambia de color morado púrpura, por acción de la enzima deshidrogenasa, la cual indica presencia de esporas bacterianas viables, y al permanecer su color amarillo (oxidado), indica que no hay presencia de esporas bacterianas viables. (Ver Fig.23)

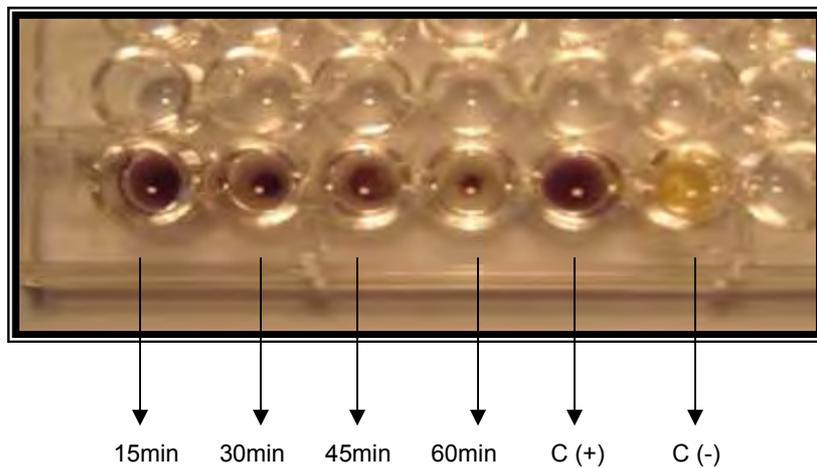


Fig. 23 Prueba cualitativa con la técnica de Mosmann.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad los desinfectantes y sanitizantes dentro de los procesos de limpieza en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y en el ramo hospitalario, son elementos clave para asegurar un resultado final de limpieza que evite un problema de contaminación de medicamentos ó foco de infección.¹³

En la revisión o auditorias realizadas se ha observado que el mayor problema ha sido una limpieza no adecuada en instalaciones farmacéuticas y hospitalarias, por lo que es necesario utilizar desinfectantes que eliminen completamente todos los microorganismos listados en la etiqueta del producto. Estos microorganismos no se limitan a bacterias, sino que pueden incluir virus, levaduras, hongos filamentosos y aun las esporas procedentes de los microorganismos.¹³

Los desinfectantes más comúnmente utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y centros hospitalarios son:

* Cloruro de benzalconio (cloruro de aquildimetilbenzilamonio ó CADBA) que pertenece a la clase de compuestos cuaternarios de amonio, tiene excelentes características para una limpieza, efectividad probada en un amplio espectro, seguridad y fácil manejo.

* Hipoclorito de sodio es un bactericida, desinfectante de amplio espectro de acción microbicida ante bacterias Gram (+), levaduras, hongos, esporas y virus. El ingrediente activo de la solución es el cloro libre, el cual presenta un olor picante de color amarillo que se utiliza para el control de microorganismos del medio ambiente. Su modo de acción se deriva de su alto poder oxidante, destruye la pared y membrana celular de los microorganismos y esporas que garantiza la total eliminación de microorganismos sin crear resistencia. Debido a la causticidad del hipoclorito de sodio, hay que evitar el contacto con la piel usando guantes de goma y lavando con agua abundante en caso de contacto, su acción oxidante provoca daño en las superficies de los instrumentos metálicos, lo cual limita su uso.

* Glutaraldehido es un bactericida, desinfectante y sanitizante, el cual posee un amplio espectro de acción microbicida ante bacterias, esporas y hongos es compatible con tenso-activo no iónico, aniónicos, cationicos y agentes alquilante, se utiliza para el control de microorganismos del medio ambiente, áreas limpias, material quirúrgico. Es necesario aclarar el instrumental desinfectado con agua destilada estéril e incluso los tejidos que hayan estado expuestos al desinfectante hay que aclararlos con agua abundante. Los inconvenientes es su toxicidad sobre piel y mucosas, produce en las personas que lo manejan dermatitis, irritación conjuntival, respiratoria e incluso asma ocupacional, también es considerable la toxicidad sobre el paciente y el medio ambiente, siendo necesario para su eliminación un abundante dilución en agua.

También es necesario indicar a las personas que lo manipulan que debido a la formación de vapores tóxicos se debe mantener en habitaciones ventiladas y no utilizar agua caliente en la preparación de las soluciones y durante la manipulación se debe utilizar guantes, gafas y mascarilla.

* Alcohol isopropílico (70%) el posee amplio espectro de acción bactericida ante bacterias Gram (+) y Gram (-), levaduras y hongos pero tiene muy poca acción sobre esporas o virus, es utilizado en la sanitización de áreas limpias en hospitales y como antiséptico cutáneo.^{3,13}

De todo lo anterior podemos observar algunas limitaciones y efectos tóxicos de algunos desinfectantes de mayor uso en hospitales e industrias farmacéuticas por lo que la empresa Esteripharma México S.A. de C.V. esta dedicada a la distribución de medicamentos de alta especialidad, biológicos y material de curación, fue introducido en mayo de 1989 en el Distrito Federal por el Sr. Mario Valbuena contando con productos todos inclinados para el tratamiento de pacientes con quemaduras, pie diabético, limpieza de heridas graves a base de soluciones de súper oxidación y antisépticos, recientemente brinda servicios de sanitización en los hospitales de la SSA e ISSTE.¹⁹

Su misión es ofrecer la más amplia gama de productos antisépticos, fórmulas de súper oxidación y servicios de sanitización de alta calidad, proporcionando a sus consumidores un servicio profesional un entorno de calidad cuanto a servicio, imagen, valores agregados que los hagan únicos y diferentes en el sector buscando preferenciar el trato humano tanto a sus clientes como a su personal y buscando siempre maximizar la rentabilidad y el valor de su empresa.¹⁹

Por lo tanto la empresa Esteripharma innovo un desinfectante y esterilizante de nombre comercial Estericide Qx el cual es una solución desinfectante de alto nivel de súper-oxidación con pH neutro. Diseñado exclusivamente para la desinfección de superficies de alto riesgo como: quirófanos (pisos, techos, paredes), salas de urgencias, de terapias intensivas e intermedias, consultorios, salas de curación.^{14, 19}

Elimina bacterias, virus y hongos en 30 segundos, esporas en 15 minutos. Esteriliza material quirúrgico (catéteres, bisturís, tijeras, agujas quirúrgicas, equipo de inhala-terapia).^{14, 19}

El Estericide Qx se usa directamente, no es tóxico a la piel y mucosas no emite vapores, por lo que no hay riesgo para las personas encargadas de realizar la desinfección de áreas ó para la esterilización en frío de instrumental quirúrgico.^{14, 19}

Es importante resaltar su cualidad de biodegradabilidad, no requiriendo un desecho especial y puede verse directamente al drenaje, la desinfección periódica de hospitales así como áreas de fabricación de inyectables junto con un programa integral ayudara a reducir contundentemente el índice de infecciones intrahospitalarias sin poner en riesgo a los pacientes, al personal de salud a los visitantes y en especial al equipo médico.^{14, 19}

Su uso es amplio desde la desinfección de quirófanos, áreas de urgencias, de esta manera reducirá los tiempos de espera para reutilizarlos, incrementando con ello la productividad de esas áreas, la esterilización en frío en material quirúrgico ó para fabricación podrá llevarse a cabo rápidamente sin tener que enjuagar después de estar en contacto con Estericide Qx por su nula toxicidad no es necesario un área especial ventilada para su almacenamiento.^{14, 19}

En un estudio realizado por la química Rosa Elba Rodríguez Camacho elaborado en el Centro de Tecnología Cemento y Concreto de Cemex en el, que evaluó la capacidad de inhibición microbiana por medio de la reducción y control del crecimiento microbiano de un concreto Profesional MR Antibac MR elaborado con componentes de baja toxicidad aplicando el método Kirby-Bauer, el cual este se utiliza para demostrar la efectividad de los agentes antimicrobianos y determinar su capacidad de inhibir el crecimiento bacterial. Para esto realizaron una serie de muestreos en distintos lugares (hospitales, planta alimenticia, granja avícola-porcina-bovina). Primeramente efectuaron una desinfección empleando un desinfectante comercial (no se hace mención del tipo de desinfectante), posteriormente se tomaron las muestras por medio de hisopos de arrastre a las 4, 8, 12, 48 horas, para este estudio emplearon *E.coli* y *S.aureus*, utilizando como testigo un concreto normal (convencional). Los resultados que obtuvieron fue zonas de inhibición alrededor de la muestra al aplicar el método Kirby-Bauer, comentando que el concreto Profesional Antibac demuestra una efectividad antimicrobiana. Sin embargo es necesario mencionar que en este estudio no se trabajo con esporas bacterianas como el realizado con el desinfectante y esterilizante (Estericide Qx) y empleando el Ensayo de Mosmann (MTT) el cual es mas sensible y confiable con respecto a Kirby-Bauer.¹⁵

En otro estudio en el cual se valoró la eficacia antimicrobiana del glutaraldehído al 2% para impresiones de polisulfuro y el hipoclorito de sodio al 1% para la desinfección de impresiones de poliéster después de una inmersión de 10 minutos, cabe mencionar que este tipo de material de impresión es utilizado en Odontología y que el proceso de esterilización a estos materiales es un procedimiento que consume mucho tiempo y puede ser perjudicial al material, que necesita mantener su estabilidad dimensional, la desinfección de la superficie de las impresiones obtenidas con estos materiales a través de productos químicos específicos parece ser la más adecuada en la rutina clínica y sabiendo que la superficie y el interior de los moldes pueden contener microorganismos que sobreviven por largos periodos,

Organismos Internacionales como la Asociación Dental recomiendan que materiales de impresión deban ser sometidos a desinfección antes de ser utilizados.

El cual diferentes agentes químicos han sido indicados para desinfección de materiales elastoméricos como hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído, que son desinfectantes utilizados en este estudio, empleando el método de Turbidez y usando bacterias de *Streptococcus mutans*, *S.aureus* y *C.albicans*.

Obteniendo resultados satisfactorios es decir no hubo turbidez en ninguno de los tubos con medio de cultivo. Es necesario indicar que los 2 desinfectantes utilizados (hipoclorito de sodio al 1% y glutaraldehído) son tóxicos sobre piel y mucosas en personas que lo manipulan y es necesario aclarar el instrumental desinfectado con agua destilada estéril. Haciendo mención que en este estudio tampoco utilizaron esporas bacterianas.¹⁶

Al realizar un estudio de comparación del efecto esporicida de dos sustancias químicas más vendidas en el mercado odontológico (Cloruro de benzalconio y Glutaraldehído al 2%) sobre instrumental odontológico, se expusieron esporas de *B.subtilis* a la acción de estos desinfectantes, al completarse el tiempo de contacto del instrumental con las sustancias desinfectantes, se procedió a incubar las esporas sobre medio de cultivo BHI por 48hrs. A 37°C, los resultados que obtuvieron fue que las esporas de *B.subtilis* no fueron eliminadas por el cloruro de benzalconio en la concentración de uso durante una hora de exposición, con este tiempo de exposición fue mucho más eficaz el glutaraldehído al 2% utilizando bajo las indicaciones del fabricante. Pero al incrementar el tiempo de exposición de 10 horas, resulto ser un poco más eficaz el cloruro de benzalconio sobre el glutaraldehído al 2%. Con los resultados se confirma que el cloruro de benzalconio carece de actividad esporicida y de propiedades esterilizantes o desinfectantes, ya que los desinfectantes para instrumental deben ser esporicidas al 100%, en las etiquetas de los productos disponibles en México tienen indicaciones, contraindicaciones y deficiencias ya que describen al cloruro de benzalconio como antiséptico, desinfectante, esterilizante y de igual manera describen al glutaraldehído. Los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que esperaban que al aumentar el tiempo de inmersión aumentaría la actividad esporicida como lo marcaba la etiqueta de ambos productos, el cual indicaba que después de 10 horas de inmersión se destruían las esporas de *B. subtilis* de esta manera afirman que ninguna de estas sustancias tiene aplicación como agente desinfectante, ni mucho menos esterilizante de instrumental dental y por lo tanto médico.²⁵

En una Universidad de Cuba realizaron una Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en industria farmacéutica, los microorganismos empleados fueron *S.aureus*, *E.coli*,

C.albicans, *A.niger* y *B.subtilis* y los desinfectantes fueron el glutaraldehído (desinfloor), amonio cuaternario (sanivec), hipoclorito de sodio (decol-NV), una formulación con alcohol etílico al 56 % con fenoles (desinmur) y alcohol etílico al 70 %, la evaluación de los desinfectantes se realizó teniendo 3.75ml de cada desinfectante y se inoculo 0.25ml de los microorganismos tomándose el tiempo de exposición (*C.albicans*, *S.aureus*, *E.coli*; 5, 10,15min., *B.subtilis*; 15, 30, 45 y 60min y *A.niger*; 15, 30 y 60 min) realizando este procedimiento a los 15 días de preparadas las soluciones de los diferentes desinfectantes, su efectividad se valoró durante el tiempo de almacenamiento. Luego de los tratamientos con los diferentes tiempos de contacto y los desinfectantes, se obtuvo que hubo una reducción total de las poblaciones microbianas de *S.aureus*, *E.coli*, *C.albicans* con los 5 desinfectantes de evaluación, lo mismo sucedió para *A.niger* con el desinfloor y el desinmur, pero esto no sucedió con *B.subtilis* en ninguno de los tratamientos durante los días de almacenamiento evaluados, sin embargo la reducción que existió oscila entre el 57-99% excepto para el desinmur y el alcohol etílico todo esto concluye que la efectividad de un proceso de desinfección puede ser máxima teniendo en cuenta los factores siguientes: seleccionar un desinfectante apropiado para el microorganismo que va a ser inactivado, si no se sabe que microorganismo es, se puede seleccionar un agente con amplio espectro de actividad como sea posible, reducir el contenido orgánico al mínimo en las superficies u objetos a desinfectar, tener en cuenta que la mayoría de los desinfectantes químicos tiene actividad limitada contra las esporas, se debe usar el desinfectante en la concentración apropiada, ya que inadecuadas concentraciones pueden resultar en la falta de desinfección y altas concentraciones puede causar problemas de toxicidad y efectos en los materiales tratados, también es necesario considerar el tiempo de exposición y sobre todo que el tiempo usado en el laboratorio puede variar de lo recomendado por los fabricantes. La eficacia del desinfectante seleccionado puede ser validada por el usuario.²⁶

Para el presente trabajo realizado las esporas bacterianas obtenidas del laboratorio de Microbiología No. 10 de Posgrado se sembraron en medio BHI en placa (condiciones aeróbicas) y en medio Anaeróbico (condiciones anaeróbicas) para de esta manera aislar e identificar las esporas bacterianas del genero *Bacillus* y genero *Clostridium* (tabla 3), para su identificación realizamos tinción de Gram (Fig.1,2) y pruebas bioquímicas (Tabla 4,5) y (Fig.3-15), este tipo de bacterias tienen una alta resistencia a agentes físicos y químicos, ya que las esporas bacterianas son formas de perdurabilidad de ciertos grupos de bacterias frente al calor, la desecación ya que la termo-resistencia es una de sus principales características, para eliminarlas son necesarias técnicas de esterilización. Son altamente dañinas para la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y hospitales causando inclusive daños incalculables.¹⁷

El propósito de trabajar con el producto Estericide Qx (desinfectante y esterilizante) fue demostrar su efecto esporicida en un tiempo de exposición de 15 minutos²⁴, sobre todo que no causa daños a tejidos humanos o de cualquier ser vivo, ya que existen agentes físicos como químicos para eliminar o evitar crecimiento de los microorganismos que pueden ser muy tóxicos. Los agentes químicos o desinfectantes empleados para la sanitización y que tienen una acción bactericida, fungicida, generalmente son a base de compuestos fenólicos, glutaraldehidos, compuestos de amonio, iones de metales pesados como son las sales de mercurio, plata y cobre, que resultan demasiados perjudiciales para los tejidos o de cualquier ser vivo.¹⁵

El proveedor nos indica que el desinfectante y esterilizante con el cual se trabajo se utiliza sin dilución y un tiempo de exposición de 15 minutos.¹⁴

En el ensayo No1 manejamos diferentes concentraciones del desinfectante y 4 tiempos diferentes que fueron 15, 30, 45 y 60 minutos y como resultados podemos observar en el Grafico No1 donde el desinfectante sin dilución tiene un efecto esporicida para el genero *Bacillus* con un tiempo de exposición de 15 minutos hasta los 60 minutos, sin embargo con las diluciones que se realizaron con el desinfectante podemos observar que existe crecimiento bacteriano desde 15 minutos hasta los 60 minutos comprobando con un control positivo y control negativo.

El Grafico No2 es solamente para corroborar que el desinfectante solamente actúa sin dilución con un tiempo de exposición de 15 hasta 60 minutos observando una buena eficiencia esporicida sobre el genero *Bacillus*.

En superficies inanimadas, por ejemplo, se logra la acción bactericida en un minuto y la desinfección de alto nivel en 15 minutos.

Esta recomendación se basa en que las esporas, o formas bacterianas vegetativas, son las que presentan mayor resistencia al ataque antimicrobiano pero que pueden erradicarse en un promedio de 15 minutos, un desinfectante es considerado de alto nivel si es capaz de destruir todo tipo de microorganismos incluyendo esporas^{14,23}

En investigaciones previas²⁰ utilizan el Ensayo de Mosmann que es una técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales y/o membranales de células viables eucariota y procariotas respectivamente a formazan purpura²¹, por medio de esta técnica se ha determinado el efecto citotóxico de algunos extractos sobre líneas celulares obteniendo resultados importantes²².

Apoyándonos en este fundamento optamos por usar dicho procedimiento, el cual nos ayudo para corroborar nuestro ensayo para el caso de esporas bacterianas del genero *Bacillus*, el cual nos indica la viabilidad de las bacterias, mostrando un color amarillo (oxidado) para las bacterias no viables y un color violeta-púrpura (reducido) para las bacterias viables, en nuestra placa se obtuvo un color amarillo a partir de un tiempo de exposición de 15 minutos hasta los 60 minutos con el desinfectante sin dilución, comparado en el control positivo y control negativo (Fig. 21) cabe mencionar que este método nos proporciona resultados mas confiables aunque en el aspecto económico el costo es elevado en la compra de microplacas.

Para el ensayo con esporas bacterianas del genero *Clostridium*, el desinfectante se trabajo en las mismas condiciones que para el genero *Bacillus*, podemos observar (Tabla 6) que existe crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones y en todos los tiempos de exposición (15,30,45 y 60 minutos), sin embargo el desinfectante sin dilución podemos observar que conforme se fue aumentando el tiempo de exposición fue disminuyendo la carga bacteriana, ya que a los 15 minutos de exposición que son los que indica el proveedor hubo crecimiento bacteriano pero a los 60 minutos reduce significativamente la carga bacteriana sin llegar a destruirlas en su totalidad (Fig. 22), con esto demostramos que el desinfectante Estericide Qx ante las esporas bacterianas del genero *Clostridium* muestra un efecto esporiostatico.

Este ensayo se pudo también corroborar al realizar la prueba cualitativa con el Método de Mosmann utilizando las muestras con el desinfectante sin dilución con los diferentes tiempos de exposición que se manejaron y pudiendo observar en la microplaca que los 15 minutos de exposición el color es púrpura intenso y conforme se aumento el tiempo de exposición el color violeta disminuyo , ya que a los 60 minutos el color violeta se ve punteado no cubre todo el pozo de la microplaca , comparado con el control positivo (Fig.23).

Para el ensayo No2 tratamos la variable de diferentes concentraciones de las esporas bacterianas con ayuda de la escala de Mac Farland, en el Grafico No.3 para el caso del genero *Bacillus* se puede observar que a una concentración de 1.0 de esporas bacterianas si existe crecimiento y en la concentración de 0.5, 0.25 y 0.12 no existe crecimiento, esto nos indica que todo depende, de la presencia de materia orgánica contaminante o del grado de contaminación, ya que al reducir la carga de esporas bacterianas, existe una desinfección de alto nivel en un tiempo de exposición de 15min.^{14,23}

7. CONCLUSIONES

- Se cumplieron satisfactoriamente los objetivos aunado a los resultados obtenidos que nos muestran que el Estericide Qx tiene un efecto esporicida.
- Con el método de Mosmann se pudo evaluar que el Estericide Qx tiene un efecto esporicida para el genero *Bacillus*.
- Se verifico que el Estericide Qx tiene un efecto esporiostatico sobre el genero *Clostridium* con ayuda del método de Mosmann.
- El Estericide Qx tiene un efecto esporicida para el genero *Bacillus* en un tiempo de exposición de 15 minutos de acuerdo a la referencia del proveedor.
- Se pudo verificar que el Estericide Qx, solamente se usa directamente (sin dilución) de acuerdo a lo indicado por el proveedor.

8. SUGERENCIAS

Se sugiere que para que el desinfectante y esterilizante (Estericide Qx) tenga un uso correcto y efectivo, es necesario realizar una limpieza exhaustiva previa a la aplicación del mismo, para que de esta manera se puedan eliminar completamente todos los microorganismos en particular las esporas bacterianas que son altamente dañinas para la industria y hospitales.

9. REFERENCIAS

1. Lain Entralgo, (1983), Panorama Histórico de la Medicina Moderna y Contemporánea, Ed.Científica, Barcelona.
2. Paúl de Kruif, (1981), Cazadores de Microbios, Ed. Mexicanos Unidos, México.
3. Reparas F., Arina P., et al., Limpieza y Desinfección en el Hospital, Anales del Sistema Sanitario de Navarra, Ed. Departamento de salud del gobierno de Navarra, (2000), Vol. 23-suplemento 2.
4. Procesos de Limpieza y su Validación en Áreas de Fabricación, Guía de Buenas Practicas de Fabricación (CIPAM), Comisión Interinstitucional de buenas practicas de fabricación de México, monografía técnica No 16.(1999)
5. Guía de Practicas Adecuadas de Manufactura para Cuartos Limpios Guía de Buenas Practicas de Fabricación (CIPAM), Comisión Interinstitucional de buenas practicas de fabricación de México, monografía técnica No 1.(1999)
6. Conceptos Básicos de Limpieza Hospitalaria
www.quiminet.com.mx
7. Landa Vargas Ma. S. et.al, Validación de Sanidad A través de Codificación por Color de los Utensilios de Limpieza, Revista Oficial de Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México Vol. 6 No1 (2005)
8. Álvarez M.C.I., Mendoza E.S.E., (1994). Manual Básico de Bacteriología, UNAM.
9. Esterilización-Desinfección-Antisépticos y Desinfectantes
www.ramosmejia.org.ar/s/infr/comend/desinf/html
10. Desinfectantes y Antisépticos
www.fa.unne.edu.ar/biología/microgeneral/micro.anez/19micro.html
11. Guía de Utilización de Desinfectantes
www.hv/uz.es/docs/guiautilizaciondesinfectantes/pdf

12. Normas de Utilización y Conservación de los Desinfectantes
www.hsd.es/es/servicios/farmacia/enlaces/internetfar/
13. Arjona A.L. La Importancia de Evaluar los Detergentes y Sanitizantes Durante los Procesos de Limpieza, Revista Oficial de Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México Vol. 6 No3 (2005)
14. Ficha técnica de Estericide Qx®
www.esteripharma.com.mx
15. Rodríguez C. Rosa E., El concreto antibac-Estudio sobre su capacidad de inhibición microbiana, Revista Construcción y Tecnología, octubre (2000)
16. Rogeli Tiburcio R., Análisis de la Eficacia de Agentes Químicos de Desinfección en Materiales Elastoméricos, Universidad Central de Venezuela, Vol. 45 No 1 (2007)
17. Endosporas y Formas de Persistencia
www.microbiologia.com.ar/esporas/indice.html
18. Arroyo Ruiz Enrique, Protocolo de Trabajo para la Verificación de Función Aséptica del Producto Esterilife
www.prodinnv.com.mx/esterilife.htm
19. Fragoso Jessica et.al, Relaciones Publicas Estratégicas para el Área de Ventas de una Empresa de Antisépticos y Servicios, Tesis profesional, Administración, IPN, Nov 2008
20. Bernardelli Amelia, et.al, In Vitro Susceptibility Testing of Mycobacterium Tuberculosis Complex Strain Isolated from Seals to Antituberculosis drugs, Buenos Aires Argentina (2004).
21. Mossman T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity assays, J. Immunol methods 1983;65.
22. Patricia Cordero Claudia, et al., Citotoxicidad de Bixina, rutina, pinitol B y ácido ent-16-kauren-19-oico aislados de especies vegetales colombianas, Revista Colombiana, Cienc. Farm.32 (2) 2003.

23. Superagua: Una Tecnología Antimicrobiana de Vanguardia. Nueva salud
www.diabetesstop.wordpress.com/2007/12/14/superagua-una-t
24. Hernández R. Águeda, Aportaciones al Estudio de la Actividad Antimicrobiana de los Antisépticos y Desinfectantes, Tesis profesional, Universidad Autónoma de Barcelona, España, 2007.
25. Aguiñada Arellano Mitzi Castalia, et al, Comparación del Efecto Esporicida de dos de las Sustancias Químicas mas vendidas en el mercado Odontológico (Benasep y Gafidex) sobre instrumental Odontológico, Higiene en el Gabinete Odontológico, enero-feb. 1995, Vol. 1., No.1.
26. Echeverría Prieto L. Carolina, et.al, Cinética de desinfección para cinco desinfectantes utilizados en Industria Farmacéutica, Revista Cubana Farm. 2007; Vol. 4, No. 2.
27. Covian Salazar Verónica del Carmen, Normas y Procedimientos de Prevención y Control de las Principales Infecciones Intrahospitalarias, Tesis Profesional, Q.F.B.FES-Cuautitlán, UNAM 2001.

GLOSARIO

Asepsia

Ausencia de microorganismos patógenos. Conjunto de procedimientos que impide la llegada de microorganismos a un medio.

Antisepsia

Proceso de destrucción de los microorganismos contaminantes de los tejidos vivos. Conjunto de procedimientos destinados a destruir los gérmenes patógenos.

Aerobio

Organismos que se desarrolla en presencia de O₂; puede ser obligado o facultativo.

Agente antimicrobiano

Cualquier agente químico o biológico que destruye o bien inhibe el crecimiento de microorganismos.

Anaerobio

Organismos que crecen en ausencia de O₂ molecular.

Bactericida

Agente que destruye a las bacterias.

Bacteriostático

Agente que inhibe el crecimiento de las bacterias sin llegar a destruirlas.

Contaminación

Entrada de organismos indeseables en algún material u objeto.

Desinfección

Proceso de destrucción de microorganismos patógenos.

Esporicida

Agente que destruye a las esporas.

Esterilización

Proceso de destrucción y eliminación de todos los microorganismos.

Limpieza

Empleo de un procedimiento fisicoquímico encaminado a arrastrar cualquier material ajeno al objeto que se pretende limpiar.

Sanitización

Reducción sustancial del contenido microbiano.

ANEXOS

Anexo 1

Medio BHI agar

1. Pesar la cantidad exacta que indica el proveedor.
2. Rehidratar con agua destilada.
3. Calentar suavemente hasta su total disolución.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb. por 15min.
5. Vaciar en cajas petri estériles de 15 a 20 ml de medio, dejar solidificar.

Medio Anaeróbico agar

1. Pesar la cantidad exacta que indica el proveedor.
2. Rehidratar con agua destilada.
3. Calentar suavemente hasta su total disolución.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb. por 15min.
5. Vaciar en cajas petri estériles de 15 a 20 ml de medio, dejar solidificar.

Medio Cooket Meat

1. Distribuir en tubos con tapón con 5ml de agua destilada el medio (carne).
2. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb. por 15min.

Anexo 2

MTT

1. Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5mg/ml.
2. Filtrar con membrana de 0.22 μ m.
3. Guardar a una temperatura de 4° C, hasta su uso.

SSFE

1. Por cada 100ml de agua destilada agregar 850mg de NaCl.
2. Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 lb. de presión, durante 15 minutos.