

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGIA**

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES CONTRA
Mycobacterium vaccae
INCIENSA, CARTAGO.**

Andrea María Sánchez Parajeles

CARTAGO, 2003

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES CONTRA *Mycobacterium vaccae*

RESUMEN

La eficacia de un desinfectante contra un determinado microorganismo debe ser previamente evaluado en el laboratorio, para así determinar las concentraciones óptimas de acción. En el presente estudio se evaluó la acción de diez desinfectantes contra *Mycobacterium vaccae* utilizando el Método Standard de la AOAC basado en carriers o simuladores de superficie. De los diez desinfectantes, cuatro se evaluaron en la prueba presuntiva; obteniéndose que el desinfectante 6 el cual es un derivado fenólico, fue efectivo contra *Mycobacterium vaccae* al 0.8%, 1% y 1.2%, por el contrario de las diluciones empleadas del desinfectante 7 (0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8%) solamente fue efectiva al 0.8%. El desinfectante 9 a base de alcohol de 70 °C y yodo, fue el único que demostró ser efectivo en todas la concentraciones utilizadas (0.5%, 1%, 1.5% y 2%); el desinfectante 10 (hipoclorito de sodio) demostró que es efectivo contra *M. vaccae* al 0.8% y 1%. Los seis desinfectantes restantes necesitaban ser neutralizados, sin embargo de los dos neutralizantes empleados ninguno neutralizó el efecto residual arrastrado por los carriers. Todas las diluciones efectivas contra *M. vaccae*, se utilizarán en un estudio posterior para ser evaluadas contra *M. tuberculosis* como una manera de confirmar dicha acción.

Palabras clave: micobacterias, *M. tuberculosis*, *M. vaccae*, desinfectantes, AOAC.

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES
CONTRA
*Mycobacterium vaccae***

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Miguel Rojas Chaves, PhD.
Profesor Guía**

**Dra. María Cecilia Matamoros,
Representante de INCIENSA**

**MSc. Johnny Peraza,
Lector**

**Andrea Sánchez Parajeles
Sustentante**

DEDICATORIA

*A **Yaveh**: padre que siempre me levantó cuando sentí desfallecer.*

*A ese amigo que nunca me ha dejado, al que aunque le he fallado siempre ha estado presente:
Jesús.*

*A **María** santísima por su intersección ante el altísimo.*

DEDICATORIA

Yo te guiaré continuamente, te daré comida abundante en el desierto, daré fuerza a tu cuerpo y serás como un jardín bien regado, como un manantial al que no le falta el agua.

Isaías 58:11

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis padres por su apoyo; a Elsa, Rebe y Don Ramón por todos estos años que me atendieron en su casa.

Gracias a la atención de todo el personal del Centro de Referencia para la Tuberculosis, en especial al Dr. Elier Solano por todo el conocimiento transmitido, al Dr. Huertas por hacer más amena mi estadía en el laboratorio y a la Dra. Maria Cecilia por permitirme realizar este trabajo en esta institución.

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMEN..... | i |
| DEDICATORIA..... | .ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | .iii |
| INDICE GENERAL..... | .iv |
| INDICE DE CUADROS..... | .v |
| INDICE DE FIGURAS..... | .vi |
| INDICE DE ANEXOS..... | .vii |
| INTRODUCCION..... | 11 |
| REVISION DE LITERATURA..... | 13 |
| Generalidades de las micobacterias..... | 13 |
| Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 16 |
| Patogenicidad..... | 18 |
| Mecanismo de Transmisión..... | 19 |
| Infección..... | 19 |
| Diagnóstico..... | 19 |
| Otras micobacterias..... | 21 |
| Resistencia de las micobacterias a los desinfectantes..... | 22 |
| Desinfectantes..... | 23 |
| Tipos de desinfectantes..... | 25 |
| Fenoles y compuestos derivados..... | 25 |
| Alcoholes..... | 26 |
| Halógenos..... | 28 |
| Metales pesados..... | 30 |
| Detergentes..... | 31 |
| Aldehídos..... | 32 |
| Nivel de actividad de los desinfectantes..... | 33 |
| METODOLOGÍA..... | 35 |
| RESULTADOS..... | 41 |
| DISCUSION..... | 50 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 55 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 56 |
| ANEXOS..... | 60 |

INDICE DE CUADROS

| Núm. | Título | Pag. |
|------|--|------|
| 1 | Clasificación de micobacterias diferentes al complejo <i>M. tuberculosis</i> | 20 |
| 2 | Resistencia de los microorganismos a los desinfectantes..... | 21 |
| 3 | Niveles de acción de los desinfectantes..... | 33 |
| 4 | Concentración de los desinfectantes a utilizar..... | 35 |
| 5 | Crecimiento de <i>M. vaccae</i> en presencia de carrier previamente colocado en la dilución mayor y menor de los desinfectantes..... | 41 |
| 6 | Efecto del neutralizante 1 sobre la dilución mayor y menor | 42 |
| 7 | Efecto del neutralizante 2 sobre la dilución mayor y menor | 42 |
| 8 | Relación existente entre la presencia de sedimento en medio Middlebrook 7H9 y el crecimiento de <i>Mycobacterium vaccae</i> | 44 |
| 9 | Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 6 contra <i>Mycobacterium vaccae</i> a una temperatura de 23 °C..... | 44 |
| 10 | Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 7 contra <i>Mycobacterium vaccae</i> a una temperatura de 23 °C..... | 46 |
| 11 | Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 9 contra <i>Mycobacterium vaccae</i> a una temperatura de 23 °C..... | 47 |
| 12 | Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 10 contra <i>Mycobacterium vaccae</i> a una temperatura de 23 °C..... | 48 |

INDICE DE FIGURAS

| Núm. | Título | Pág. |
|------|---|------|
| 1 | Composición de la cubierta de las micobacterias..... | 12 |
| 2 | Estructura de los ácidos micólicos..... | 13 |
| 3 | Morfología característica de una colonia de micobacteria..... | 17 |
| 4 | Morfología de <i>M. tuberculosis</i> H37R _a en medio Löwestein-Jensen.. | 17 |
| 5 | Colonia de <i>M. tuberculosis</i> en un estado inicial, muestra su crecimiento en de forma de cordón..... | 17 |
| 6 | Prueba de la tuberculina (PPD)..... | 19 |
| 7 | Prueba de la tuberculina realizada con 2 unidades de PPD, se observa induración, vesiculación y necrosis..... | 19 |
| 8 | Análisis cualitativo de la cantidad de bacterias arrastrada por el carrier..... | 40 |
| 9 | Análisis cuantitativo de la cantidad de bacterias arrastrada por el carrier..... | 40 |
| 10 | Control de viabilidad de la bacteria (izquierda), control de esterilidad del medio y del carrier(derecha)..... | 49 |

INDICE DE ANEXOS

| Núm. | Título | Pág. |
|-------------|---|-------------|
| 1 | Método Oficial de la AOAC 965.12..... | 59 |
| 2 | Solución de alcohol yodado al 2%..... | 60 |
| 3 | Carriers utilizados en la evaluación de los desinfectantes..... | 61 |
| 4 | Dimensiones de los carrier utilizados..... | 61 |
| 5 | Evaluación de los desinfectantes..... | 62 |

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que ha padecido la especie humana (Caminero, 2003; Mancilla, 1998). La causa de esta enfermedad se debe al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que abarca además de *M. tuberculosis*, a *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microtti* (Caminero *et al.* 1998; Forbes *et al.* 1998). Todas las micobacterias poseen una característica en común: la resistencia al alcohol ácido; esta propiedad se debe a la presencia en la superficie de la célula de lípidos especiales llamados ácidos micólicos (Madigan *et al.* 1999; Stanier *et al.* 1986).

Dentro de las micobacterias existen las de crecimiento rápido y las de crecimiento lento; *M. tuberculosis* es una especie de crecimiento lento, pudiendo tardarse semanas para obtener colonias visibles (Madigan *et al.* 1999; Forbes *et al.* 1998). Las especies de micobacterias con menos lípidos crecen más de prisa, lo que hace pensar que el carácter hidrofóbico de la superficie celular hace a las bacterias impermeables a los nutrientes y a otras sustancias como lo son los desinfectantes (Madigan *et al.* 1999; Forbes *et al.* 1998).

Varios autores mencionan la resistencia que poseen las micobacterias a los productos químicos (León *et al.* 2002; Madigan *et al.* 1999 y Casal *et al.* 1999). Es por ello importante identificar aquellos productos químicos que puedan eliminar este tipo de bacterias, para así asegurarse que en los lugares donde se manipulan cultivos y muestras para diagnóstico, así como en los hospitales se disminuya el riesgo de una contaminación.

Como menciona León *et al.* (2002) existen numerosos métodos para evaluar un desinfectante, algunos de ellos son estándares y otros métodos que se han utilizado a través del tiempo, para determinar la eficacia de los desinfectantes contra bacterias, virus y hongos; se tienen por ejemplo los métodos estándares europeos los cuales son normados por la CEN (European Committee for Standardización) o los estándares de Norte América que como el de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ofrecen un protocolo para evaluar la eficacia de los desinfectantes; sin embargo como citan León *et al.* (2002) no existe un método universal para la evaluación de la actividad micobactericida de los desinfectantes.

En la actualidad, tanto en los laboratorios de la Caja Costarricense del Seguro Social como en INCIENSA, que es sede del Centro Nacional de Referencia para la Tuberculosis, se emplean el fenol y el cloro para la desinfección de ciertas áreas donde se realizan trabajos con la bacteria de la tuberculosis. El fenol es extremadamente tóxico y el cloro provoca corrosión sobre ciertos materiales. Sobre el fenol la NIOSH (1976) menciona que entre los efectos adversos de este compuesto sobre la salud del ser humano, se tienen las quemaduras en la piel, abortos, dificultades para tragar,

cambios pigmentarios en la piel, daños en el páncreas, cáncer de piel, pérdida de peso y leucocitosis entre otras.

A la fecha no se cuenta con ningún estudio a nivel nacional de otros desinfectantes que se puedan emplear para la desinfección de estas áreas de trabajo; es por ello que es de suma importancia identificar aquellos productos que ofrezcan acción contra *Mycobacterium tuberculosis*, que no sean corrosivos sobre las áreas donde se aplican y que además no sean tan tóxicos para el ser humano.

El presente estudio trata de determinar los desinfectantes efectivos contra *Mycobacterium tuberculosis*; utilizando como guía el método oficial de la AOAC 965.12 "Tuberculocidal Activity of Disinfectants" (con algunas modificaciones), el cual se basa en carriers o simuladores de superficie. La USEPA entidad responsable de normar los estándares en Norte América prefiere aquellos métodos basados en "carriers" debido a que se relacionan más con la realidad. En la prueba presuntiva se utilizó *Mycobacterium vaccae* en lugar de *M. smegmatis* por ser más fácil de manipular en el laboratorio.

Al final del estudio se sugerirán aquellos desinfectantes que ofrezcan acción contra *M. vaccae*, para que en una investigación posterior se utilicen los desinfectantes que fueron efectivos contra esta micobacteria en una prueba confirmativa contra *M. tuberculosis* u otra micobacteria que ofrezca mayor resistencia a diferentes desinfectantes.

Objetivo general:

- ✓ Evaluar la capacidad bactericida de algunos desinfectantes contra *Mycobacterium vaccae*

Objetivos específicos:

- ✓ Optimizar el método oficial de la AOAC de acuerdo a las facilidades del CNRTB.
- ✓ Determinar la especie de mycobacterium para realizar la prueba presuntiva.
- ✓ Determinar la concentración óptima a la cual los desinfectantes seleccionados ejercen su acción contra *Mycobacterium vaccae*.
- ✓ Determinar los desinfectantes que deben ser neutralizados antes de ser evaluados en la prueba presuntiva.
- ✓ Comparar los resultados obtenidos para identificar él o los desinfectantes más eficaces contra *Mycobacterium vaccae*.

2.1. GENERALIDADES DE LAS MICOBACTERIAS

La familia Mycobacteriaceae comprende el género *Mycobacterium* que abarca un grupo de más de 100 especies, algunas de estas causan enfermedades en humanos; sin embargo una gran mayoría son especies saprófitas, y se encuentran en el agua y suelo, éstas podrían causar enfermedad en el ser humano sólo cuando las defensas están gravemente disminuidas (Forbes *et al.* 1998; Casal *et al.* 1999).

Daffé & Draper (1998) describen que la cubierta de las micobacterias está formada por tres componentes: la membrana plasmática, la pared y la cápsula (**Figura 1**). Aunque las principales biomoléculas de cada una de estas partes se conoce, la distribución de otros constituyentes es poco entendido. Daffé & Draper (1998) mencionan además que la membrana plasmática parece ser una membrana bacteriana típica, no obstante sin embargo juega un papel importante en el proceso patológico. Con respecto a la pared de las micobacterias, Daffé & Draper (1998) señalan que es parecida a la de las bacterias Gram positivas, pero con una inusual capa de lípidos (ácidos micólicos) los cuales forman una barrera permeable para las moléculas polares; por su parte la composición de la cápsula de estas bacterias, consiste de polisacáridos y proteínas con trazas de lípidos (Daffé & Draper, 1998).

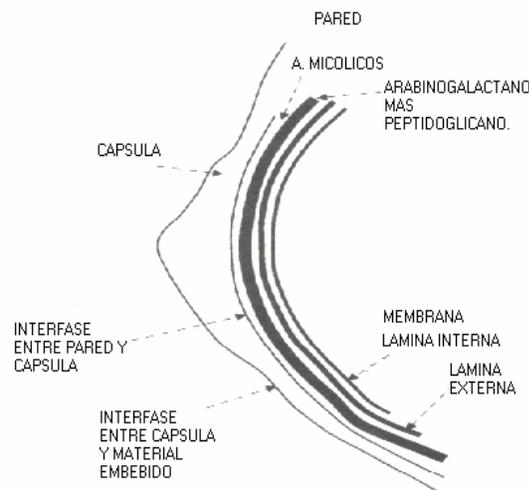


Figura 1: Composición de la cubierta de las micobacterias.
Tomado de Daffé & Draper (1998).

Las micobacterias poseen una característica en común: la resistencia al alcohol ácido (Rivas, 2002; Stanier *et al.* 1986). Esta característica exclusiva de las

micobacterias, fue descubierta por Robert Koch cuando realizó su estudio con la bacteria de la tuberculosis (Madigan *et al* 1999).

Rivas (2002) y Stanier *et al.* (1986) describen la ácido resistencia como la propiedad de las micobacterias de resistir la decoloración con soluciones de alcohol-HCl, después del proceso de tinción bacteriológica con fucsina y fenol. Así las células micobacterianas que han sido teñidas con una disolución fenólica caliente de fucsina básica, retienen este colorante rojo al tratarlas con un ácido inorgánico diluido como el H₂SO₄ o HCl, no así otro tipo de bacterias que son rápidamente decoloradas por el tratamiento ácido (Stanier *et al.* 1986). La resistencia al alcohol ácido conocida también como la tinción Ziehl-Neelsen la presentan las micobacterias en algún momento de su crecimiento, y se debe a la presencia en la superficie de la bacteria (sobre la capa de peptidoglicano) de lípidos esenciales, llamados ácidos micólicos (Madigan *et al.* 1999; Prescott *et al.* 1999). Los ácidos micólicos son ácidos de cadena larga (de 79 a 90 átomos de carbono), que poseen un grupo hidroxilo en el carbono β y una cadena alifática ligada al carbono α (**Figura 2**).



Figura 2: Estructura de los ácidos micólicos
Tomado de Madigan *et al.* (1999).

Madigan *et al.* (1999), sugieren que ésta resistencia se debe a que la fucsina se combina con el ácido micólico, este último forma un complejo con el peptidoglicano de la pared de las micobacterias impidiendo así el contacto con el disolvente ácido-alcohol. La característica resistencia al alcohol ácido, puede ser eliminada al extraer con etanol alcalino los lípidos o fracción lipoide de la superficie de la membrana (Prescott *et al.* 1999). Si se eliminan estos lípidos de la superficie de la célula y se aplica la tinción de Gram, se obtiene que las micobacterias son verdaderas bacterias Gram positivas (Madigan *et al.* 1999).

2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

En 1882 Robert Koch anunció al mundo el descubrimiento del microorganismo causante de la tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*. En 1881 cuando Kock inició esta investigación una de cada siete personas morían debido a la tuberculosis (Madigan *et al.* 1999; Bernard *et al.* 1968). El bacilo de la tuberculosis y el hombre han convivido

desde hace unos 10 mil años cuando inició la domesticación del ganado; se cree que *Mycobacterium tuberculosis* derivó de *M. bovis*, microbio causante de la tuberculosis bovina (Caminero, 2003; Mancilla, 1998).

En la actualidad se sabe que la tuberculosis es causada por un complejo de bacterias. El término complejo se usa frecuentemente en microbiología clínica para describir dos o más especies cuya distinción es complicada y de poca o ninguna importancia médica (Forbes *et al.* 1998). La tuberculosis como mencionan Forbes *et al.* (1998) es causada por un complejo de bacterias que abarca *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*; Caminero *et al.* (1998) mencionan además a *M. microtti* dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Cuando se presentan enfermedades pulmonares causadas por el complejo ***Mycobacterium tuberculosis***, el microorganismo causante es clínicamente, radiológicamente y patológicamente indistinguible (Forbes *et al.* 1998). Prescott *et al.* (1999) mencionan que los síntomas comunes de la tuberculosis son fiebre, sudoración nocturna, pérdida del apetito y pérdida de peso. Un paciente con tuberculosis pulmonar puede presentar además una tos productiva, o sea síntomas que no son sólo parecidos a los de la gripe sino que también a los de la bronquitis o neumonía (Forbes *et al.* 1998). Brooks *et al.* (1992) señalan que el bacilo de la tuberculosis puede afectar a cualquier órgano, haciendo que las manifestaciones clínicas sean muy variadas. Además de las lesiones pulmonares que son las más comunes, se pueden presentar alteraciones en el aparato urinario, en el sistema nervioso central, en la laringe e inclusive se puede dar una diseminación por la circulación sanguínea provocando una tuberculosis miliar con lesiones en muchos órganos y con una alta tasa de mortalidad.

La tuberculosis es una de las enfermedades, como se mencionó anteriormente, de las más antiguas que ha padecido la humanidad y la que más muertes ha producido a lo largo de la historia. En la actualidad esta enfermedad continúa siendo un problema de salud a nivel mundial; Prescott *et al.* (1999) y Daffé & Draper (1998) mencionan que en la actualidad esta enfermedad provoca la muerte a nivel mundial de más de 3 millones de personas cada año. Mata & Obando (2002) indican que en Costa Rica entre los años 1999- 2002 se registraron en los centros de salud de la Caja Costarricense del Seguro Social, 2774 enfermos de tuberculosis, la mayoría de estos casos se presentan en personas mayores de 25 años y con mayor incidencia sobre el sexo masculino; estos mismos autores señalan que la tasa de mortalidad para el mismo periodo fue de 17.39 por 100.000 habitantes; además indican que la forma de tuberculosis que se diagnostica con más frecuencia es la pulmonar, la cual representa un 84% de los casos. Entre las formas extrapulmonares que se determinan con mayor frecuencia se tiene la tuberculosis ganglionar y la pleural.

2.2.1. CARACTERISTICAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

2.2.1.1 Estructura:

En general las micobacterias pueden variar en su morfología entre formas cocoides pequeñas hasta largos filamentos sin embargo *Mycobacterium tuberculosis* suele tener una morfología característica: es un microorganismo de forma bacilar que no forma esporas, de aproximadamente 2 a 10 μm de largo y de 0,2 a 0.5 μm de ancho (Forbes *et al.* 1998). Son ligeramente curvos o rectos, bordes redondeados, no móviles, no esporulados, catalasa positivos y con una especial conformación de la pared (Rivas, 2002; Prescott *et al.* 1999).

Como un constituyente de la pared celular de las micobacterias, se tiene el peptidoglicano, el cual se une por medio de enlaces covalentes a un polímero: ácido micólico-galactosa-arabinosa; este complejo lipo-polisacárido-peptidoglicano es quien proporciona el carácter hidrofóbico a la superficie celular de las micobacterias (Madigan *et al.* 1999; Rivas, 2002). En las bacterias que no son micobacterias, el peptidoglicano está formado por dos derivados de azúcares: el N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, sin embargo Forbes *et al.* (1998) mencionan que en las micobacterias el ácido N-acetilmurámico es sustituido por el ácido N-glicolilmurámico.

2.2.1.2 Crecimiento:

Madigan *et al.* (1999), mencionan que las micobacterias se pueden separar en dos grupos principales: las de crecimiento lento y las de crecimiento rápido. El crecimiento principalmente de las especies patógenas es lento, así las micobacterias no patógenas que se encuentran en el suelo y agua tienen tasas de crecimiento superiores (Stanier *et al.* 1986).

Mycobacterium tuberculosis se ubica dentro de las micobacterias de crecimiento lento; pudiendo necesitar desde unos días o hasta semanas para producir colonias visibles a partir de un inóculo diluido. El crecimiento lento de las micobacterias probablemente se deba al carácter hidrofóbico de la superficie celular, esta hidrofobicidad hace que las bacterias sean impermeables a los nutrientes, así las especies con menos lípidos crecen más rápido (Madigan *et al.* 1999; Forbes *et al.* 1998).

El bacilo de la tuberculosis es un aerobio estricto, (o sea que su crecimiento es dependiente de la presencia de oxígeno) (Prescott *et al.* 1999; Stanier *et al.* 1986 y Bernard *et al.* 1968), sin embargo Mancilla (1998) comenta en su trabajo "Descifran el código Genético del Bacilo de Koch" que se ha caracterizado un grupo de genes que capacitan a *M. tuberculosis* para sobrevivir en condiciones anaeróbicas. Además Caminero *et al.* (1998) señalan que este microorganismo es muy resistente al frío, a la congelación y a la desecación siendo por el contrario muy sensible al calor, a la luz solar y a la luz ultravioleta. Brooks *et al.* (1992) citan que los bacilos tuberculosos son

muy resistentes a la desecación y que pueden sobrevivir por largos periodos en esputos secos.

En su mayoría las micobacterias, presentan requerimientos nutricionales y físicos relativamente sencillos, un pH entre 6.7 -6.8 y una temperatura de 37 °C(Rivas, 2002). Así crecen en medios sencillos con sales minerales, amonio cuaternario como fuente de nitrógeno y glicerol o acetato como fuentes de carbono (Madigan *et al.* 1999; Bernard *et al.* 1968) sin embargo Stanier *et al.* (1986) y Prescott *et al.* (1999) mencionan que las micobacterias no patógenas no requieren factores de crecimiento mientras que los requerimientos de las especies patógenas son complejos.

El crecimiento de *M. tuberculosis* se estimula con la adición de lípidos o ácidos grasos, por lo que se suele agregar a los cultivos yema de huevo, con el fin de obtener un crecimiento mayor. El medio de cultivo Lowenstein-Jensen, es un medio con glicerina y huevo completo, esto lo hace un medio adecuado para el aislamiento y conservación de *M. tuberculosis* (Madigan *et al.*1999). Bernard *et al.* (1968) mencionan además que la asparagina o mezclas de aminoácidos se agregan para promover la iniciación y mejorar el porcentaje de crecimiento. Ante circunstancias metabólicas adversas, el bacilo de la tuberculosis entra en un estado latente o durmiente, pudiendo demorar en su multiplicación desde varios días o hasta años (Caminero *et al.*1998).

Cuando las micobacterias crecen en medio sólido, suelen formar colonias apretadas, compactas y arrugadas en vez de estar esparcidas por la superficie del agar (**Figura 3**). Esto se debe probablemente al gran contenido de lípidos y a la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular (Madigan *et al.*1999). Cuando las colonias del bacilo de la tuberculosis se hacen visibles se pueden reconocer fácilmente ya que como mencionan Burton & Williams (1971) y Finegold *et al.* (1983) son típicamente secas, friables, rugosas, conglomeradas, duras, no pigmentadas y se adhieren fuertemente al medio. Stanier *et al.* (1986), mencionan que en medio líquido y sin ningún detergente, las micobacterias se adhieren formando una dura película en la superficie y una capa de crecimiento pegado a la pared del frasco que contiene el medio de cultivo.



Figura 3: Morfología característica de una colonia de micobacteria. Tomado de Madigan *et al.* (1999).



Figura 4: Morfología de *M. tuberculosis* H37R_a en medio Löwestein-Jensen. Fuente: CNRTB, INCIENSA.

2.2.2. Patogenicidad:

La virulencia de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* se ha relacionado con la formación de estructuras longitudinales en forma de cuerda o cordón (**Figura 5**), que se forman ya sea en medio líquido o sólido, estos cordones se forman por la agregación y entrelazado de largas cadenas de bacterias (Madigan *et al.* 1999; Rivas, 2002). Burton & Williams (1971) mencionan además que las cepas no virulentas carecen generalmente de la capacidad para formar estos cordones o cuerdas característicos. A partir de bacilos virulentos se ha extraído por medio de éter de petróleo, un “factor formador de cordones” (trehalosa-6,6-dimicolato).

Varios aspectos señalan a este factor como responsable del poder patógeno: a) trehalosa-6,6-dimicolato es una sustancia realmente tóxica e inhibe la migración de los leucocitos, b) provoca granulomas crónicos, c) si se administra una dosis de 10 µg a un ratón en forma subcutánea provoca su muerte y d) es más abundante en las cepas virulentas (Brooks *et al.* 1992 y Bernard *et al.* 1968).

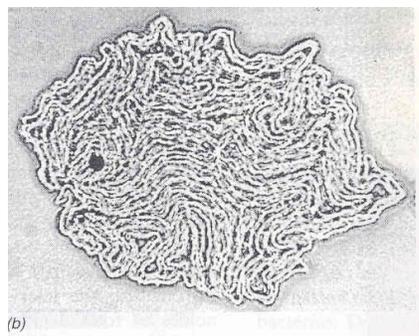


Figura 5: Colonia de *M. tuberculosis* en un estado inicial, muestra su crecimiento en forma de cordón. Tomado de Madigan *et al.* (1999).

2.2.3. Mecanismo de transmisión de la tuberculosis:

El principal mecanismo de transmisión y el que causa casi la totalidad de los contagios es la vía aerógena. Caminero *et al.* (1998) y Forbes *et al.* (1998) señalan que la transmisión se da cuando una persona enferma elimina núcleos de gotitas o microgotas (en forma de aerosoles) al toser, hablar, cantar o estornudar. De las microgotas liberadas por la persona enferma, las que poseen un tamaño menor a los 10 µm pueden quedar suspendidas en el aire o bien ser inhaladas por un sujeto sano. Harries *et al.* (1997) indican que generalmente la transmisión se produce bajo techo, debido a que en estas condiciones los núcleos de gotitas se mantienen por más tiempo, por el contrario en lugares ventilados los núcleos se eliminan rápidamente.

Bernard *et al.* (1968) y Forbes *et al.* (1998) señalan que el pequeño tamaño de las microgotas hace que estas puedan pasar la barrera de los cilios bronquiales y que alcancen así los alvéolos. Es en esta parte distal del pulmón donde *M. tuberculosis* encuentra las condiciones ideales (elevada tensión de oxígeno) para multiplicarse. Forbes *et al.* (1998) citan además que aerosoles infecciosos pueden también ser producidos por las manipulaciones en el procesamiento de especímenes clínicos en los laboratorios, pudiendo afectar a los trabajadores de estos sitios.

2.2.4. Infección :

Una vez que los bacilos de *M. tuberculosis* llegan al alveolo pulmonar provocan la fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares; si los bacilos son escasos o de virulencia atenuada los macrófagos pueden destruirlos y la infección es entonces controlada, pero si por el contrario los bacilos son numerosos y con un grado de virulencia considerable, éstos no solo serán capaces de vivir dentro del macrófago sino que también podrán multiplicarse en su interior y terminarán por destruirlo (Caminero *et al.* 1998).

Andreu (1999), señala que la destrucción de las bacterias produce una lesión en el tejido epitelioide donde se acumulan macrófagos y linfocitos, dicha lesión se conoce como granuloma y su función es la de aislar los bacilos impidiendo así que se diseminen.

2.2.5. Diagnóstico:

El diagnóstico de la tuberculosis se realiza por una serie de pruebas; Prescott *et al.* (1999); Andreu (1999) y Caminero *et al.* (1998) señalan que entre estas, se pueden citar: la prueba de la tuberculina (PPD), diagnóstico microbiológico, técnicas de imagen (radiografía de tórax), así como por cromatografía y por sondas de ADN. Sin embargo Caminero (2003) menciona que dentro de estos métodos diagnósticos el estudio microbiológico es el más importante y el único que puede aportar con certeza la presencia de la enfermedad

2.2.5.1 Prueba de la tuberculina(PPD): La tuberculina es un derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*, que se inyecta intradérmica (**Figura 6**); así si la persona ha estado en contacto con esta bacteria, se formará una induración o enrojecimiento en la zona que fue aplicado, esto al cabo de 48-72 horas(**Figura 7**)(Prescott *et al.*1999; Andreu, 1999; Caminero *et al.*1998). Estos dos últimos autores indican que la PPD puede resultar positiva si el paciente ha estado en contacto con otras micobacterias no tuberculosas, así como en pacientes vacunados con BCG; de manera que no sirva de prueba diagnóstica.

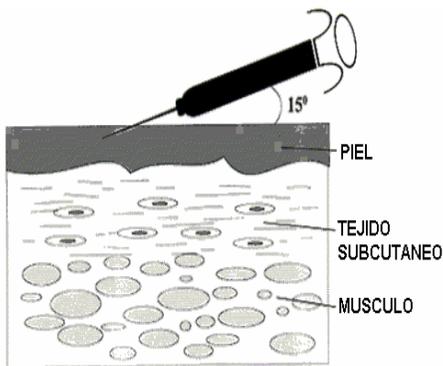


Figura 6: Prueba de la tuberculina (PPD), aplicada intradérmica. Tomado de Andreu (1999).



Figura 7: Prueba de la tuberculina realizada con 2 unidades de PPD, se observa induración, vesiculación y necrosis. Tomado de Caminero (2003).

2.2.5.2 Diagnóstico Microbiológico: Caminero *et al.* (1998) citan que el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis, se basa en dos etapas:

- ◆ Demostración de la presencia de bacilos resistentes al alcohol ácido (BAAR) en las muestras de pacientes, ya sea por la técnica Ziehl-Neelsen o la variante de tinción con fluorocromos.
- ◆ Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* u otras micobacterias en cultivo puro, así como su posterior identificación a nivel de especie.

2.2.5.3 Técnicas de imagen: Una radiografía de tórax que muestre lesiones radiológicas sugestivas de tuberculosis, sólo debe indicar que se deben realizar estudios microbiológicos, y no el diagnóstico de esta enfermedad(Caminero *et al.*, 1998).

2.2.6. Otras micobacterias

Las micobacterias que no forman parte del complejo “*Mycobacterium tuberculosis*” ni del complejo *M. leprae* han recibido diferentes nombres a través del tiempo; Casal *et al.* (1999) mencionan que estas se clasifican en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, tomando en cuenta la velocidad de crecimiento y la producción de pigmentos en ausencia o presencia de luz. Las micobacterias fotocromógenas son las que producen pigmentos en presencia de luz, las escotocromógenas producen pigmentos independientemente si se exponen a la luz y las no cromógenas no producen pigmentos. **Ver Cuadro 1**

Cuadro 1: Clasificación de micobacterias diferentes al complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae* (Tomado de Casal *et al.* 1999).

| Grupos de crecimiento lento | Grupo fotocromógenas(I) | Grupo escotocromógenas(II) | Grupo no cromógenas(III) |
|------------------------------|--|---|---|
| | <i>M. kansasii</i> ☼ <i>M. asiaticum</i> <i>M. intermedium</i> | Pigmento rosa-rojo: <i>M. lactis</i> . Pigmento amarillo-naranja: <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> ☼ <i>M. flavescens</i> <i>M. szulgai</i> ☼ Pigmento irregular: <i>M. xenopi</i> ☼ <i>M. simiae</i> ☼ <i>M. ulcerans</i> ☼ | <i>M. avium</i> ☼ <i>M. intracellulare</i> ☼ <i>M. gastri</i> <i>M. terrea</i> <i>M. triviale</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. malmoense</i> ☼ <i>M. haemophilum</i> ☼ <i>M. shimoidei</i> <i>M. celatum</i> ☼ <i>M. interjectum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. genavense</i> ☼ |
| Grupos de crecimiento rápido | Grupo fotocromógenas(IV) | Grupo escotocromógenas(V) | Grupo no cromógenas(VI) |
| | <i>M. marinum</i> ☼ | Pigmento rosa-rojo: <i>M. engbaeckii</i> Pigmento amarillo-naranja: <i>M. acapulcense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. gadium</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. obuense</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. tokaiense</i> Pigmento irregular: <i>M. phlei</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. austroafricanum</i> | <i>M. fallax</i> <i>M. fortuitum</i> ☼ <i>M. chelonae</i> ☼ <i>M. abscessus</i> ☼ <i>M. agri</i> <i>M. chitae</i> <i>M. moriokaiense</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. mucogenicum</i> |

☼Micobacterias que pueden producir enfermedades en el ser humano.

2.2.7. Resistencia de las micobacterias a los desinfectantes

León *et al.* (2002); Madigan *et al.* (1999) y Casal *et al.* (1999) mencionan que las micobacterias son más resistentes a los desinfectantes que otras bacterias no esporuladas. Además, el Comité de Seguridad Microbiológica de la Harvard Medical School (2001), hace referencia a esta resistencia, la cual se esquematiza en el **cuadro 2**. Se observa en este cuadro que la resistencia de las micobacterias es sólo menor a la de las esporas bacterianas.

Cuadro 2: Resistencia de los microorganismos a los desinfectantes (Tomado del Comité de Seguridad Microbiológica de la Harvard Medical School, 2001).

**Menos
Resistentes**

| | |
|------------------------------|--|
| VIRUS PEQUEÑOS | Virus Herpes simplex Cytomegalovirus Virus Respiratorios Virus de la Hepatitis B Virus de Inmunodeficiencia Humana(VIH). |
| BACTERIAS VEGETATIVAS | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> |
| FUNGI | <i>Trichophyton</i> sp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Candida</i> sp. |
| VIRUS MEDIANOS | Poliovirus Coxsackievirus Rhinovirus |
| MYCOBACTERIA | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; <i>M. bovis</i> |
| ESPORAS BACTERIANAS | <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium sporogenes</i> |

**Más
Resistentes**

2.3. DESINFECTANTES

2.3.1. Definición de desinfectante:

Un desinfectante se define como un agente generalmente de origen químico o de origen natural, que mata las células vegetativas pero no necesariamente las esporuladas de los microorganismos productores de enfermedades (Madigan *et al.*, 1999; Prescott, *et al.* 1999; Block, 1983;). Block (1983) al igual que Boyd (1984) mencionan que el término desinfectante se refiere a las sustancias que se utilizan sobre superficies inanimadas.

García (1995) señala que en la actualidad existen una gran cantidad de compuestos químicos que pueden utilizarse para controlar los microorganismos. Algunos de estos compuestos químicos conocidos como bacteriostáticos, pueden actuar inhibiendo el crecimiento y/o metabolismo de los microorganismos; otros pueden matar los microorganismos, a estos últimos se les conoce como bactericidas (Block, 1983). Prescott(1999), García(1995) Pelczar & Chan(1981) mencionan la importancia de conocer las características del agente químico a utilizar, así por ejemplo es indispensable saber el modo de acción, contra los microorganismos que actúa, las condiciones que influyen en la acción del agente químico y las limitaciones que este posee. Además citan que aunque no existe un agente químico que sea ideal para todo tipo de situaciones, un desinfectante adecuado debería tener las siguientes características:

1. **Actividad antimicrobiana:** el desinfectante debería tener elevada actividad antimicrobiana o amplio espectro a bajas concentraciones y a temperatura ambiente.
2. **Solubilidad:** el agente antimicrobiano debería ser soluble en agua u otros solventes en la medida suficiente o necesaria que permita su uso eficaz.
3. **Estabilidad:** no deberían acontecer grandes cambios en el producto a utilizar mientras este se encuentre almacenado; los cambios mencionados implican que no se debe dar una pérdida significativa de la acción antimicrobiana.
4. **Toxicidad selectiva:** lo ideal sería que el desinfectante fuese efectivo contra los microorganismos e inocuo para las personas y animales.
5. **Estable ante materia orgánica:** Existen desinfectantes que se combinan con la materia orgánica, haciendo que si éste se utiliza en presencia de considerable cantidad de materia orgánica, este se inactive.
6. **No corroer- ni manchar:** lo ideal sería que al aplicar el desinfectante sobre ciertas áreas este no debería de corroer, así mismo no debería manchar o estropear tejidos.
7. **Propiedad desodorante:** sería deseable que el producto además de desinfectar eliminara olores en el área donde se aplica.

8. **Capacidad detergente:** una gran ventaja sería si un producto además de desinfectante fuera detergente (agente limpiador) ya que esto mejoraría la efectividad.
9. **Disponibilidad y costo:** el desinfectante debe ser de fácil acceso y costo.

2.3.2. Factores que afectan la eficacia de un desinfectante.

La eficacia de un desinfectante está influenciada por una serie de factores. Entre estos factores se pueden citar las características y el número de microorganismos, la concentración del desinfectante, el pH, la presencia de materia orgánica que pueda interferir con la acción del germicida y el tiempo de exposición del desinfectante (Prescott, *et al.* 1999; Boyd, 1984).

2.3.2.1 Características de los microorganismos:

Las diferentes especies de microorganismos como mencionan Pelczar & Chan (1981) difieren en su susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. La composición química de los microorganismos (su pared, su membrana) influye en el tipo de desinfectante que se utiliza para eliminarlos. Por ejemplo ciertos virus como los de la influenza y los herpesvirus poseen cubiertas lipídicas que los protegen de los agentes químicos (Boyd, 1984).

2.3.2.2 Concentración del desinfectante:

Pelczar & Chan (1981) comparan a la concentración del desinfectante como a balas que se lanzan contra un blanco (los cuales vendrían a ser los microorganismos). Señalan que conforme se aumenta la concentración del agente químico (hasta un cierto límite) las bacterias morirán más deprisa. Así por ejemplo una concentración de 4.25g/L de fenol requiere de aproximadamente 10 horas para conseguir el mismo efecto obtenido en 1.5 horas a una concentración de 6.04g/L.

Algunos desinfectantes que poseen acción bactericida a altas concentraciones a menudo poseen acción bacteriostática a bajas concentraciones, además si la concentración es lo suficientemente baja el desinfectante podría incluso actuar como estimulante del crecimiento del microorganismo (Boyd, 1984).

2.3.2.3 El pH

El pH afecta el grado de ionización, la cual es una propiedad importante para algunos desinfectantes. Si el pH del desinfectante o del material a ser desinfectado es extremo, una reducción en la actividad del desinfectante se podría esperar (Boyd, 1984). Iañez (1998) menciona además que el pH afecta la carga superficial neta de la bacteria y que en general las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas siendo por lo tanto más efectivos; así los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos contrario a los agentes catiónicos que suelen mostrar más eficacia a pH alcalinos.

2.3.2.4 Presencia de materia orgánica

La existencia de materia orgánica en el lugar donde se aplica el desinfectante puede reducir significativamente la efectividad del agente químico aplicado ya sea inactivándolo o protegiendo al microorganismo de él. Pelczar & Chan (1981) mencionan asimismo que la materia orgánica presente en el área de la desinfección podría producir alguno los siguientes fenómenos:

- ◆ Formación de un producto que no es microbicida, al combinarse el desinfectante con el material orgánico.
- ◆ Formación de un precipitado al unirse el desinfectante con la materia orgánica, esto provocaría que el desinfectante no se pueda unir con los microorganismos.
- ◆ Acumulación de materia orgánica sobre la superficie de la bacteria lo que produciría una especie de cubierta que dificultara la entrada del agente químico.

2.4. Tipos de desinfectantes

Existen una gran cantidad de desinfectantes, sin embargo a continuación se citan algunos de los principales grupos de sustancias químicas utilizadas para la desinfección de diversos materiales:

2.4.1. Fenoles y compuestos derivados:

El fenol o ácido carboxílico es uno de los agentes antibacteriales más viejos, usados en el ambiente hospitalario. Este compuesto químico fue utilizado por primera vez por Lister en 1867, el cual lo aplicó a instrumentos quirúrgicos así como a ropa utilizada en las cirugías, obteniendo una reducción en las infecciones post-operativas (Boyd, 1984; Pelczar & Chan, 1981; Block, 1983). En la actualidad el fenol tiene relativamente poco uso, esto se debe a que existen otros compuestos fenólicos que son más efectivos y activos a concentraciones relativamente bajas (García, 1995; Pelczar & Chan, 1981).

En la página del Berkeley Lab (sf), se menciona que los desinfectantes fenólicos se usan frecuentemente para la desinfección de superficies contaminadas como paredes y pisos entre otros. Este mismo autor señala que los compuestos fenólicos son efectivos en la eliminación de bacterias (incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*), hongos y virus que contienen lípidos, sin embargo no son activos contra las esporas ni contra virus no lipídicos.

Modo de acción:

Prescott, *et al.* (1999); Boyd, 1984; Block (1983) y Pelczar & Chan (1981) explican que el mecanismo de acción del fenol a altas concentraciones sobre las bacterias es **desnaturalizando proteínas y dañando membranas celulares**. Block (1983) además señala que la eventual muerte de las bacterias al ser expuestas a bajas concentraciones de fenol, se debe a la inactivación de enzimas esenciales. La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos se ve reducida por pHs alcalinos y por la presencia de materia orgánica (García, 1995; Pelczar & Chan, 1981); además su acción se incrementa con altas temperaturas (Brenes *et al.* 1986).

Ventajas del fenol y compuestos derivados:

- ◆ Germicidas contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y contra el bacilo de la tuberculosis.
- ◆ Estables al almacenamiento.
- ◆ Menos afectados por materia orgánica que otros desinfectantes.

Desventajas del fenol y compuestos derivados:

- ◆ Poseen baja solubilidad en agua por lo que es necesario agregar agentes emulsificadores (jabones).
- ◆ Al estar en contacto prolongado con superficies de hule puede provocar su deterioro.
- ◆ Pueden provocar irritación en ojos y piel.
- ◆ Son relativamente más caros que otros desinfectantes igualmente efectivos.
- ◆ Alta toxicidad.

2.4.2. Alcoholes:

Los alcoholes se encuentran entre los desinfectantes y antisépticos más utilizados (Prescott *et al.* 1999); Block (1983) menciona que estos compuestos poseen muchas características deseables, entre estas se pueden citar la acción bactericida contra las formas vegetativas, de fácil acceso y costo. Prescott *et al.* (1999) señalan también el efecto bactericida, fungicida pero no esporicida, citan además el efecto que puede tener este producto químico contra algunos virus que contienen lípidos. Pelczar & Chan (1981) y Boyd (1984) además de señalar el efecto bactericida citado anteriormente, sugieren que las concentraciones del alcohol para lograr tal efecto deben estar entre el 50%-70%, sin embargo García (1995) cita que para eliminar microorganismos en su forma vegetativa en forma efectiva, las concentraciones que se deben utilizar van desde el 70%-90%.

Entre los dos alcoholes germicidas más utilizados se encuentran el etanol y el isopropanol (Prescott *et al.* 1999; Boyd, 1984); el alcohol metílico o metanol posee menos efecto bactericida que el etanol, además es muy tóxico, Pelczar & Chan (1981) comentan que los vapores de este compuesto (metanol) pueden producir un daño permanente en los ojos; es por su toxicidad que generalmente no se utiliza como desinfectante. Block (1983) señala que la acción bactericida de los alcoholes alifáticos incrementa con el aumento del peso molecular, no obstante Pelczar & Chan (1981) discuten que aquellos alcoholes con un peso molecular mayor al del alcohol propílico e isopropílico, no son miscibles con el agua y por lo tanto no se utilizan comúnmente como desinfectantes.

Modo de acción:

Los alcoholes actúan sobre las bacterias desnaturalizando las proteínas; además al ser los alcoholes disolventes de lípidos, pueden dañar la membrana celular provocando la deshidratación de la célula bacteriana (Prescott *et al.* 1999; Madigan *et al.* 1998; Boyd, 1984; Pelczar & Chan, 1981; García, 1995). Jañez (1998) señala que los alcoholes desorganizan las bicapas lipídicas penetrando en la región hidrocarbonada de los lípidos.

Block (1983) menciona que la desnaturalización de las proteínas por parte de los alcoholes está sujeta a la presencia de agua, así en ausencia de agua las proteínas no se desnaturalizan tan fácilmente como cuando el agua está presente. Esto explica porque el alcohol etílico absoluto el cual es un agente deshidratante, es un agente menos bactericida que las mezclas de alcohol con agua. La efectividad de los alcoholes se ve influenciada por la cantidad de materia orgánica presente, es por ello que estos compuestos químicos se deben aplicar sobre superficies limpias (García, 1995).

Ventajas de los alcoholes:

- ◆ Los alcoholes poseen actividad germicida contra un amplio espectro de especies de bacterias así como de muchos virus.
- ◆ Actúan rápidamente.
- ◆ Compatibles cuando se combinan con otros desinfectantes como amonios cuaternarios, compuestos fenólicos o yodo; incrementando así su efecto sobre los microorganismos.
- ◆ Fácil acceso y costo.

Desventajas:

- ◆ Los alcoholes se evaporan rápidamente, teniendo así un tiempo de exposición limitado.
- ◆ No actúan contra las esporas bacterianas.

2.4.3. Halógenos

Los halógenos flúor, cloro, bromo y yodo; pertenecen al grupo VIIA de la tabla periódica. Existen en forma de moléculas diatómicas en estado libre y forman compuestos similares a sales con sodio y la mayoría del resto de los metales; sin embargo el cloro y el yodo son los más usados como agentes antimicrobianos (Prescott *et al.* 1999).

♦ Cloro:

lañez (1998) señala que el cloro fue uno de los primeros antisépticos en utilizarse aún antes de conocerse su mecanismo de acción; este mismo autor menciona que Holmes en Boston en 1835 y Semmelweiss en Viena en 1847 introdujeron este desinfectante en la práctica de los médicos y parteras para impedir la transmisión de la sepsis puerperal que era contagiada de mujer a mujer por las manos de los doctores y de las parteras, y que era una notable causa de mortalidad de mujeres .

El cloro aunque es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la tierra, no se encuentra en forma libre en la naturaleza, sin embargo se puede encontrar en combinación con el sodio, potasio, calcio y magnesio (Block, 1983). Como mencionan lañez (1998) y Pelczar & Chan (1981) el cloro ya sea como gas, hipocloritos o cloramidas es uno de los desinfectantes más ampliamente utilizado.

Modo de acción:

El efecto germicida del cloro en cualquiera de sus formas se debe a la formación del ácido hipocloroso (ecuación 1) que se forma al mezclar cloro con agua (García, 1995; Block, 1983; Pelczar & Chan, 1981).



El ácido hipocloroso formado se descompone así:



García(1995) y Pelczar & Chan(1981) citan que el oxígeno liberado(ecuación 2) es un agente oxidante muy fuerte y con la capacidad de destruir a los microorganismos debido a la acción que ejerce sobre los constituyentes celulares, así se une de forma directa con enzimas y proteínas de la membrana celular y las logra inactivar. Block (1983) además señala que el efecto bactericida del cloro es producido por la inhibición de ciertos sistemas enzimáticos esenciales para la vida, debido a la acción oxidativa del cloro sobre los grupos SH de enzimas vitales o de

otras enzimas sensibles a la oxidación con cloro; Auccasi (1999) menciona también que el cloro ataca grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina. La inhibición de reacciones metabólicas esenciales es la principal causa de la destrucción de la célula bacteriana (Block, 1983).

Block (1983) asimismo indica que la eficacia del cloro como desinfectante decrece con un incremento en el pH; lañez (1998) por su parte señala que la disociación del ácido hipocloroso se lleva a cabo a un pH menor de 7. Montero (2003), García (1995) y Block (1983) se refieren a la influencia de la materia orgánica sobre el cloro, así entre mayor cantidad de materia orgánica presente en el área a desinfectar mayor será la concentración requerida debido a que la acción de este desinfectante se ve reducida ante esta.

◆ Yodo:

El yodo es uno de los más antiguos y eficaces agentes bactericidas. Este germicida fue oficialmente reconocido por la Farmacopea de Estados Unidos en 1830. El papel fundamental con bases científicas sobre la eficiencia de este producto como germicida fueron publicados entre 1874 y 1881; así en 1874 Davaine encontró que el yodo era uno de los antisépticos más eficaces. Basándose en los resultados de Davaine, Koch experimentó el efecto desinfectante del yodo contra las esporas del ántrax (Block, 1983).

Este halógeno es el que posee mayor peso molecular (126,904); Block (1983) y Pelczar & Chan (1981) indican que el yodo elemental es ligeramente soluble en agua y forma una solución color café. En solventes polares como alcoholes, cetonas o ácidos carbónicos el yodo se disuelve con un color café, sin embargo cuando se disuelve con solventes no polares como el CCl₄ y/o benceno adquiere un color violeta (Block, 1983). Boyd (1984), Pelczar & Chan (1981) y García (1995) señalan que el yodo es fácilmente soluble en alcohol y soluciones acuosas de yoduro potásico o sódico; además que esta mezcla conocida como tintura de yodo se ha utilizado tradicionalmente como antiséptico. Boyd (1984) y Pelczar & Chan (1981) indican además que el yodo se combina con moléculas orgánicas y forma lo que se llama iodóforos; estas moléculas orgánicas son agentes activos de superficie que van a actuar como portadores y solubilizadores del yodo.

Brenes et al. (1986), Pelczar & Chan (1981) y García (1995) se refieren a que el yodo es considerado como el único agente químico que posee acción contra toda clase de bacterias inclusive contra esporas, hongos y en menor grado contra virus. Brenes et al. (1986) indican que la destrucción de las esporas bacterias por parte del yodo depende de las condiciones a las que están expuestas, a la cantidad de materia orgánica y al grado de deshidratación de las mismas.

Modo de acción:

Se cree que el modo de acción del yodo se debe a su poder oxidante y a la capacidad que este halógeno posee de combinarse con el aminoácido tirosina, el cual es un componente de enzimas y proteínas; al combinarse el yodo con este aminoácido hace que la proteína cambie su estructura y por ende su actividad (García, 1995; Brenes et al. 1986; Madigan et al. 1998). García (1995) indica que al igual que con otros desinfectantes, la efectividad del yodo se ve reducida por la presencia de materia orgánica.

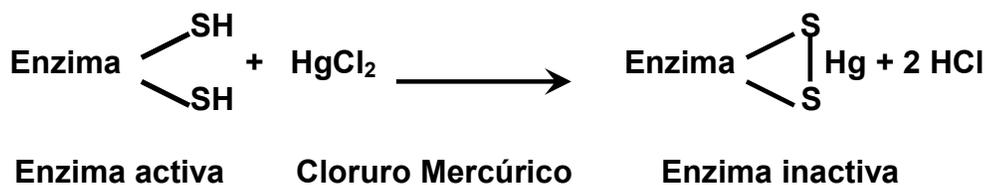
2.4.4. Metales Pesados

Metales como el cobre, el mercurio y la plata poseen efecto letal contra los microorganismos aún en pequeñas cantidades, este efecto es conocido como la acción oligodinámica, palabra derivada del griego “oligos” que significa pequeño y “dynamis” que significa poder (Pelczar & Chan, 1981). García (1998) y Pelczar & Chan (1981) comentan que este efecto de los metales pesados ha sido utilizado para controlar poblaciones microbianas en pinturas, textiles, en el agua y en la preparación de ungüentos antisépticos. Estos mismos autores mencionan que además de los metales pesados como tales, existen numerosos compuestos derivados de estos que poseen actividad germicida o antiséptica; entre estos se pueden citar el mertiolato, mercurocromo, metphen que son utilizados como antisépticos; el nitrato de plata que es utilizado en la prevención de infecciones gonocócicas; y los compuestos de cobre que son muy utilizados como fungicidas en la agricultura.

Modo de acción:

Según mencionan García (1995), Brenes et al. (1986) y Pelczar & Chan (1981) el modo de acción de los metales pesados y de sus derivados es la combinación con proteínas y enzimas esenciales del metabolismo celular, provocando la desnaturalización de las mismas y por ende su inactivación.

Pelczar & Chan (1981) en su libro Elementos de Microbiología esquematizan como el cloruro de mercurio inactiva enzimas que contienen grupos sulfhidrilo:



2.4.5. Detergentes

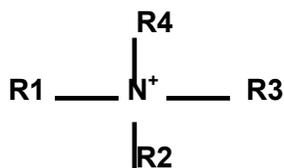
Los detergentes se definen como aquellos agentes que rebajan la tensión superficial, y son empleados principalmente para limpiar superficies (García, 1995; Brenes *et al.* 1986; Pelczar & Chan, 1981). Iañez (1998) indica que los detergentes sintéticos al igual que los jabones poseen una porción hidrofóbica y una porción hidrofílica; esto les permite formar micelas en solución acuosa, así como formar capas que cubren y solubilizan moléculas hidrófobas.

Pelczar & Chan (1981) mencionan que desde el punto de vista químico, los detergentes se clasifican en dos grupos:

2.4.5.1. Aniónicos: son aquellos que al ionizarse tienen la propiedad detergente en el anión. Un ejemplo de detergente aniónico, es el jabón, García (1995) menciona que aunque es un antiséptico muy débil es importante para remover los microorganismos; el jabón emulsifica y dispersa grasas, así los microorganismos son arrastrados en la espuma cuando se enjuaga con agua. Iañez (1998) además cita a las saponinas, sales biliares, ácidos grasos disociables, SDS o laurilsulfato de sodio y sulfonato de alquilbenceno como detergentes aniónicos.

Modo de acción: Iañez (1998) indica que la acción de los detergentes aniónicos se debe a la capacidad de estos de provocar una gran disrupción de las membranas (lisis), la acción de estos detergentes se da principalmente a pHs ácidos y sobre bacterias Gram Positivas, las bacterias Gram Negativas no son afectadas debido a que quedan protegidas por la barrera de lipopolisacárido de la membrana externa. Iañez (1998) y Boyd (1984) señalan que combinando los desinfectantes aniónicos con ácidos se obtienen desinfectantes muy potentes y de rápida acción.

2.4.5.2. Catiónicos: una vez que se ionizan la propiedad detergente queda en el catión. Iañez (1998) y Pelczar & Chan (1981) indican que los detergentes catiónicos son más efectivos contra las bacterias que los compuestos aniónicos; los principales detergentes catiónicos son los llamados compuestos de amonio cuaternario o Quats (del inglés Quaternary Ammonium Compounds). La fórmula general de los compuestos de amonio cuaternario es la siguiente:



Los Quats se caracterizan por poseer un nitrógeno cuaternario cargado positivamente y donde de R1- R4 son cadenas de hidrocarburos variados (Prescott *et al.* 1999). Block (1983) menciona que estos hidrocarburos pueden ser iguales o no, saturados o insaturados, ramificados o no ramificados así como cíclicos o acíclicos; lañez (1998) señala que las sales de amonio cuaternario más activas son aquellas que tienen tres grupos alquílicos cortos y un grupo alquílico largo: cloruro de cetilpiridini y cloruro de benzalconio.

El poder bactericida de los Quats es elevado contra bacterias Gram Positivas y ligeramente menos efectivo contra las Gram Negativas; los Quats pueden mostrar efecto bacteriostático en diluciones muy por debajo de la concentración bactericida efectiva (Pelczar & Chan, 1981).

Modo de acción: Gracias a la porción hidrófoba los Quats pueden penetrar en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se une con los fosfatos de los fosfolípidos provocando la disrupción de la membrana celular, es aquí cuando el detergente puede entrar al interior de la célula bacteriana y provocar la desnaturalización de proteínas (lañez, 1998; Pelczar & Chan, 1981). Pelczar & Chan (1981) citan además que los Quats inhiben enzimas esenciales; por su parte lañez (1998) indica que la acción de amonios cuaternarios se mejoran a pH alcalino.

La actividad de los Quats se reduce por la presencia de jabones o detergentes aniónicos, por el agua dura y materia orgánica (Montero, 2003; Prescott *et al.* 1999; Boyd, 1984; Pelczar & Chan, 1981).

2.4.6. Aldehídos

Entre los aldehídos más utilizados con fines de desinfección se tienen el formaldehído y el glutaraldehído (Prescott *et al.* 1999 y Pelczar & Chan, 1981). lañez (1998) nombra a estos compuestos como alquilantes y menciona que son agentes esterilizantes, activos tanto sobre células vegetativas como sobre esporas; sin embargo Montero, (2003); Prescott *et al.* (1999) y Pelczar & Chan (1981) comentan que para lograr la esterilización se requiere un largo periodo de exposición que van desde las 10 hasta las 12 horas.

Formaldehído: Es un gas estable solamente a elevadas concentraciones y a elevadas temperaturas; puede adquirirse en solución acuosa como formalina, la cual posee del 37 al 40 por ciento de formaldehído y tiene una alta actividad antimicrobiana; los vapores del formaldehído bajo condiciones apropiadas, se utilizan para la esterilización de un área cerrada, sin embargo debido a su carácter irritativo y vapores nocivos es rara vez utilizado como desinfectante (Pelczar & Chan, 1981). La formalina es usada en la preparación de vacunas debido a que inactiva microorganismos pero no destruye sus propiedades antigénicas (Prescott *et al.* 1999).

Glutaraldehído: El glutaraldehído es un di-aldehído, y uno de los desinfectantes preferidos debido a que es activo en soluciones al 2%, contra bacterias vegetativas, hongos, virus y como se mencionó anteriormente contra esporas bacterianas y fúngicas (Prescott *et al.* 1999; Pelczar & Chan, 1981).

Modo de acción: Tanto el formaldehído como el glutaraldehído ejercen su efecto letal por la acción alquilante de proteínas y ácidos nucleicos. Dicha alquilación se produce al reemplazarse hidrógenos lábiles de ciertos grupos químicos como NH₂, -OH, -COOH y -SH, produciendo hidroximetilaciones y entrecruzamientos (Iañez, 1998).

2.5. Nivel de actividad de los desinfectantes

De acuerdo al nivel de acción, los desinfectantes se pueden clasificar en desinfectantes de alto nivel, de nivel intermedio y de bajo nivel (**Ver Cuadro 3**) (Auccasi, 1999; Prescott *et al.* 1999; Block, 1983; Pelczar & Chan, 1981).

2.5.1 Nivel de desinfección alto:

Block (1983) indica que para que un desinfectante sea considerado de alto nivel, este debe ser efectivo contra endosporas bacterianas, así si el tiempo de contacto es lo suficientemente prolongado, el germicida podrá ser utilizado como esterilizante; sin embargo este mismo autor y Auccasi (1999) comentan que la ausencia de esporas no es segura aunque el número de estas sí se reduce después del tratamiento con el germicida. Auccasi (1999) señala asimismo que los desinfectantes clasificados como de alto nivel tienen la capacidad además de destruir las bacterias vegetativas, al bacilo de la tuberculosis, hongos, virus lipídicos y no lipídicos.

2.5.2 Nivel de desinfección intermedio:

Auccasi(1999), Block(1983) y Pelczar & Chan(1981) mencionan que este tipo de desinfectantes son aquellos que matan las bacterias vegetativas, algunos hongos, al bacilo de la tuberculosis, así como a la mayor parte de virus, sin embargo no eliminan las esporas bacterianas.

2.5.3 Nivel de desinfección bajo:

Los desinfectantes con un nivel bajo de desinfección son aquellos que matan las bacterias vegetativas, algunos hongos y virus con lípidos y tamaño medio; sin embargo no son capaces de destruir las esporas bacterianas ni el bacilo de la tuberculosis (Auccasi, 1999; Block, 1983; Pelczar & Chan, 1981).

Cuadro 3: Niveles de acción de los desinfectantes (Tomado de Auccasi, 1999; Prescott *et al.* 1999; Block, 1983; Pelczar & Chan, 1981).

| Nivel de actividad del desinfectante | Bacterias | | | Hongos | | Virus | |
|--------------------------------------|------------|--------------------|---------|--------|----------------------------|-------------------------------|--|
| | Vegetativa | Bacilo tuberculoso | Esporas | | Con lípidos y tamaño medio | Sin lípidos y tamaño pequeño. | |
| Alto | + | + | + | + | + | + | |
| Intermedio | + | + | - | + | + | + | |
| Bajo | + | - | - | ± | + | - | |

El presente estudio se realizó en el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), específicamente en el Centro de Referencia de la Tuberculosis. La evaluación de la acción tuberculicida de cada uno de los desinfectantes se realizó tomando como referencia el Método Oficial de la AOAC (965.12) (Anexo 1), con algunas modificaciones. Únicamente se realizó la prueba presuntiva, de la cual se identificaron aquellos desinfectantes que eliminaron *Mycobacterium vaccae*; en una etapa posterior se utilizarán estos desinfectantes contra *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1. Microorganismos:

Se utilizaron dos especies de micobacterias: *Mycobacterium vaccae* (ATCC 25950) y *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37R_a (ATCC 25177). Con *M. vaccae* se realizó una prueba presuntiva para identificar aquellos desinfectantes que pudieran eliminar esta bacteria; una vez identificados estos desinfectantes se procederá a probar cada uno de estos con *M. tuberculosis* como una forma de confirmar la acción bactericida.

3.2. Desinfectantes utilizados:

Se probaron diez desinfectantes, con la siguiente composición química:

Desinfectante 1: alcohol isopropílico, n-Butoxietanol, Nonilfenol etoxilado, sal de amonio cuaternario, sal sódica EDTA.

Desinfectante 2: corresponde a un amonio cuaternario de cuarta generación: cloruro de alquil dimetilbencil amonio.

Desinfectantes 3 y 4: corresponden a amonios cuaternarios de quinta generación, la variación se da en el pH; el primero posee un pH de 10.43 y el segundo de 8.09

Desinfectante 5: glutaraldehído.

Desinfectante 6: #2 fenilfenol, p-tercer amilfenol. pH: 12.3

Desinfectante 7: p-tercer amilfenol, #2 fenilfenol, ácido fosfórico, isopropanol. pH: ~1

Desinfectante 8: ácido cítrico e iones plata generados electrolíticamente.

Desinfectante 9: yodo, ioduro de potasio y alcohol de 70°.

Desinfectante 10: Hipoclorito de sodio comercial al 12 %.

3.3. Tiempo de exposición y concentración de los desinfectantes:

El tiempo de exposición para cada uno los “carriers” ¹ (o simulador de superficie) en cada una de las diluciones del respectivo desinfectante es de 10 minutos y las concentraciones de los desinfectantes a emplear se puede observar en el Cuadro 4.

Cuadro 4: Concentración utilizada de los desinfectantes a evaluar.

| Desinfectante | Concentración a evaluar | | | | Desinfectante | Concentración a evaluar | | | |
|---------------|-------------------------|------|-------|-----------|---------------|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 1%, | 4%, | 7% | 10% | 6 | 0,6%, | 0,8% | 1,0% | 1,2% |
| 2 | 4,0% | 8,0% | 10,0% | 12,0 % | 7 | 0.2% | 0.4% | 0.6% | 0.8% |
| 3 | 10 % | 15 % | 20% | 25% | 8 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| 4 | 10 % | 15 % | 20% | 25% | 9* | ppm 0,5%, | ppm 1,0% | ppm 1.5% | ppm 2,0% |
| 5 | 1,0% | 2,0% | 4,0% | 6,0% | 10 | 0.3% | 0.5% | 0.8% | 1.0% |

*La preparación de dicho desinfectante se hizo de acuerdo al anexo 2.

3.4. Procedimiento:

Como se mencionó anteriormente, se utilizó como referencia el método Oficial de la AOAC 965.12 “Tuberculocidal Activity of Disinfectants”, sin embargo fue necesario hacer ciertas modificaciones con el fin de adaptar dicho protocolo a las facilidades con que se contaba en el laboratorio.

3.4.1 Modificaciones al método de la AOAC 965.12:

El método de la AOAC 965.12 (AOAC, 1995) indica que *M. smegmatis* es la bacteria que se utiliza en la prueba presuntiva y *M. bovis* en la prueba confirmativa; sin embargo en el presente estudio se utilizó en la prueba presuntiva *M. vaccae*, para la prueba confirmativa en un próximo estudio se utilizará *M. tuberculosis* H37Ra

Los carriers sugeridos por el método de la AOAC son de porcelana y las dimensiones son 6mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y una longitud de 1 cm, sin embargo los utilizados en la presente investigación son de vidrio borosilicato y de 1.5 cm de longitud; así como en vez de utilizar el medio Proskauer-Beck se empleó el medio comercial Middlebrook 7H9.

¹ Cada carrier es un fragmento de vidrio hueco (tubo) con 6mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 1.5 cm de longitud. Ver anexo 3 y 4.

3.4.2 Pruebas preliminares

Antes de iniciar el protocolo como tal, fue necesario hacer una serie de pruebas para determinar las condiciones óptimas de trabajo.

3.4.2.1 Inóculo:

Mycobacterium vaccae (ATCC 25950): se determinó que a partir de un Mc Farland 5, se podría obtener al sexto día de incubación una tramitancia entre el 45% y 50% al inocular 0.3 mL de dicho Mc Farland en 20 mL de medio Middlebrook 7H9.

Mycobacterium tuberculosis H37Ra (ATCC 25177): Aunque *M. tuberculosis* no se utilizó debido a que no se realizó la prueba confirmatoria; si se determinó la cantidad de bacteria a inocular para obtener la tramitancia necesaria. Se determinó que a partir de un Mc Farland 5 se obtuvo una tramitancia entre 45% al 50% a los 15 días, que al igual que con *M. vaccae* se obtuvo al inocular 0.3 mL del Mc Farland 5 en 20 mL del medio Middlebrook 7H9.

La tramitancia de ambas bacterias se ajustó al 70% agregando medio Middlebrook 7H9. La medición de la tramitancia se realizó con un Colorimeter BioMérieux V1210 a una longitud de onda de 450 nm.

3.4.2.2 Cantidad de bacterias arrastrada por el carrier:

Prueba cualitativa:

Se colocaron 9 carriers en una suspensión de bacterias que poseía una tramitancia del 70%; dicha suspensión de bacterias se inoculó 6 días antes con 0.2 mL de una suspensión de bacterias que correspondía en opacidad al Mc Farland 5. A la suspensión de bacterias se le agregó 1.5 mL de gelatina estéril al 2% por cada 10 mL de suspensión de bacteria. Los carriers se mantuvieron en la suspensión de bacterias por un periodo de 15 minutos, posteriormente se colocaron en posición vertical en una placa Petri cubierta con papel filtro y se incubaron por un periodo de 45 minutos a 37 ° C; una vez secos los carriers se colocaron en placas petri que contenían medio Löwestein-Jensen. Se incubaron a 37 ° C por un periodo de 6 días. Se montó además un carrier estéril para que funcionara como control.

Prueba cuantitativa:

Se colocaron 10 carriers estériles, en una suspensión de bacterias que poseía una tramitancia del 70%; dicha suspensión de bacterias se inoculó 6 días antes con 0.2 mL de una suspensión de bacterias que correspondía en opacidad al Mc Farland 5. Por cada 10 mL de suspensión de bacterias se agregó 1.5 mL de

gelatina estéril al 2%. La gelatina utilizada es gelatina bacto Difco 0143. Los carriers se mantuvieron en la suspensión de bacterias por un periodo de 15 minutos, posteriormente se colocaron en posición vertical en una placa Petri cubierta con papel filtro y se incubaron por un periodo de 45 minutos. Transcurridos este tiempo se tomó cada uno de los carriers y se agregó uno a uno a 10 mL de medio Middlebrook 7H9, se agitó vigorosamente y posteriormente se tomó 0.2 mL de dicho medio y se colocó en tubos con medio Löwestein-Jensen. Se incubó a 37 ° C por un periodo de 6 días. El crecimiento se indicó por cruces: (+) entre 50-100 colonias; (++) entre 100-200 colonias; (+++) 200-500 colonias que indican un crecimiento masivo que ocupa toda la extensión del medio Löwestein-Jensen.

3.4.2.3 Cantidad de bacterias que se desprenden del carrier y permanecen en el desinfectante:

Para determinar la cantidad de bacterias que puedan desprenderse del carrier y quedar en el desinfectante; se realizó una prueba siguiendo la misma metodología que en la etapa presuntiva; sin embargo en lugar de colocar cada uno de los carrier en un desinfectante particular, se colocó en 10 mL de agua destilada estéril. Se introdujeron 20 carrier en una suspensión de bacterias que fue inoculada 6 días antes. Después de medir la transmitancia y ajustarla al 70% se le agregó la gelatina estéril al 2% en una proporción de 1.5 mL por cada 10 mL de suspensión de bacteria. Los carrier se introdujeron en la suspensión de bacteria y se mantuvieron por 15 minutos, tras lo cual colocaron en posición vertical en una placa Petri cubierta con papel filtro y se incubaron a 37 ° C por 45 minutos. Transcurrido el tiempo necesario para que cada uno de los carrier se seque, se tomó cada uno de ellos y a intervalos de 30 segundos se agregaron a 10 mL de agua destilada estéril. Cuando se colocó el último de los carrier ya habían transcurrido 9 minutos con 30 segundos, se esperó 30 segundos más y se empezaron a sacar del agua; el agua en la que estos estaban se agitó totalmente y seguidamente se tomó 0.2 mL de esta agua y se inoculó en medio Löwestein-Jensen. Se incubaron 6 días a 37 ° C.

3.4.2.4 Uso de neutralizantes:

Se determinó la necesidad de utilizar neutralizantes, para cada uno de los desinfectantes utilizados. Para esto se hizo la mayor y la menor dilución a ser empleada de cada uno de los desinfectantes a ser probados; seguidamente se colocaron 20 carriers en 20 mL de medio 7H9 que previamente se había homogenizado con 3 mL de gelatina al 2%, aquí se dejaron por 15 minutos; posteriormente y con ayuda de una pinza se colocaron en posición vertical en una caja Petri cubierta con papel filtro; finalmente se incubaron a 37° C por 45 minutos. Todo esto con el fin de simular las mismas condiciones a ser utilizadas en la prueba presuntiva como en la confirmativa. Una vez que los carriers estuvieran secos se agregaron a la mayor y menor dilución de cada uno de los

desinfectantes y se mantuvieron por 10 minutos; transcurrido este tiempo se sacaron, se les drenó el exceso del químico y se sembraron en 10 mL de medio Middlebrook 7H9. Se agitó y se agregó 0.2 mL de una suspensión de bacterias que correspondía al Mc Farland 1. Se agitó y se incubó a 37 ° C por 12 días.

3.4.2.5 Neutralizantes utilizados

Para neutralizar los desinfectantes que así lo requerían, se prepararon dos neutralizantes sugeridos por la AFNOR (Asociación Francesa de Normalización). Ambos son a base de lecitina; el primero es al 0.07% de lecitina y 0.5 % de polisorbato 80, este se denominó **Neutralizante 1**; el segundo es un poco más concentrado: al 1% de lecitina y 5% de polisorbato 80 o Tween 80, el cual se denominó **Neutralizante 2**. Ambas mezclas se agregaron al medio de cultivo en un porcentaje de 10 %(V/V).

Una vez agregado el neutralizante al medio de cultivo, se colocaron los carriers previamente expuestos al desinfectante, en esta solución. Seguidamente se inoculó en ella 0.2 mL de una suspensión bacteriana que corresponde al Mc Farland 1. Se agitó por 10 segundos y se incubó por 6 días a 37 ° C. Se montaron controles positivos, los cuales consistieron en inocular 0.2 ml de un Mc Farland 1 en el medio que contenía el neutralizante.

3.4.3 Prueba presuntiva con *Mycobacterium vaccae*

3.4.3.1 Inoculación de la bacteria:

De *Mycobacterium vaccae* (ATCC 25950) se preparó una suspensión en agua destilada estéril a una concentración cuya opacidad correspondía al tubo 5 de la escala de Mc Farland, de dicha suspensión se inoculó 0.3 mL en 20 mL del medio Middlebrook 7H9, dichas cantidades fueron experimentalmente determinadas con el fin de obtener una tramitancia cercana al 50% al sexto día . Una vez inoculado dicho medio, se incubó durante 6 días a 37 °C. Dicho medio se utilizó para colocar los “carriers” y realizar las pruebas con cada uno de los desinfectantes.

3.4.3.2 Evaluación del desinfectante: (ver anexo 5)

Trascurrido el tiempo de incubación descrito anteriormente, (6 días); se le midió la tramitancia al medio y se ajustó agregando medio Middlebrook 7H9 estéril; hasta obtener una tramitancia del 70%. Se tomó 40 mL del medio inoculado y se le agregó 1.5 mL de gelatina estéril por cada 10 mL de medio, o sea se agregó 6 mL de gelatina estéril al 2%. Se agitó para homogenizar la mezcla y posteriormente se agregaron 21 carriers, dejándolos 15 minutos en la suspensión de bacterias. Trascurrido este tiempo se sacaron de la suspensión de bacterias y se colocaron en posición vertical en una caja Petri cubierta con papel filtro estéril, se colocó ésta en la incubadora por 45 minutos; una vez que los carriers estuvieron secos, se tomó uno a uno y se agregaron a intervalos de 30

segundos a tubos que contenían 10 mL de la solución del desinfectante a utilizar; de esta forma se agregaron 20 carriers, el “carrier” restante se agregó directamente a 7mL del medio Middlebrook 7H9 para que actuara como control.

Transcurridos los 10 minutos de contacto entre el carrier contaminado y la solución del desinfectante se tomó el carrier con una pinza, se le drenó el exceso de desinfectante, se colocó en 7 mL del medio Middlebrook 7H9 y se incubó a 37 ° por un periodo de 6 días. Transcurrido este periodo se tomaron los 20 tubos que contenían cada carrier, se agitó por 10 segundos y se trasvasó el medio a un tubo cónico de 25 mL para centrifuga. Se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm. Después de centrifugar se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0.2 mL de agua destilada estéril. Se agitó, se sembró en un medio Löwestein Jensen y se incubaron por 7 días a 37 °C. Los desinfectantes que lograron eliminar *Mycobacterium vaccae*, se seleccionaron para realizar la prueba confirmativa con *Mycobacterium tuberculosis* en una etapa posterior del estudio.

3.4.3.3 Controles con Fenol al 5%

Además del control mencionado anteriormente (carrier contaminado e inoculado en medio Middlebrook 7H9), se colocaron 20 carrier contaminados con *Mycobacterium vaccae* en fenol al 5%, todo esto siguiendo la misma metodología utilizada para realizar la prueba presuntiva. Dicho control funcionó como negativo pues después de exponer los carriers a este compuesto e inocularlos en medio Middlebrook 7H9 no se debe presentar crecimiento. El fenol al 5% se preparó a partir de Phenol de Sigma 991 P-1037 Lot 21 K1445 y agua destilada.

3.5 Relación existente entre el sedimento formado en el medio Middlebrook 7H9 y el crecimiento obtenido en el medio Löwestein-Jensen.

Con los resultados obtenidos al realizar la prueba con el fenol al 5%, surgió la duda de si existía relación entre el sedimento formado en el medio Middlebrook 7H9 y el crecimiento de la bacteria. Es por ello que después de 7 días de incubación se tomaron todos los tubos utilizados con el desinfectante 6 y los del fenol al 5% en los cuales se observaba sedimento y se identificaron, de igual manera aquellos donde no existía este sedimento. Así, después de la centrifugada e inoculada de cada uno de los tubos con el sedimento obtenido, se podría hacer una relación entre los tubos en donde creció *Mycobacterium vaccae* y aquellos en los que se presentó el sedimento; en otras palabras ver si el mencionado sedimento del medio Middlebrook 7H9 representaba bacterias viables de *Mycobacterium vaccae*.

4.1 Pruebas preliminares:

4.1.1 Cantidad de bacterias arrastrada por los carriers:

Para determinar la cantidad de bacteria que arrastraba cada uno de los carriers, se realizó una prueba cualitativa en la cual se demostró que efectivamente el carrier está arrastrando bacterias (Figura 7); sin embargo era necesario determinar a nivel de cantidad el total de bacterias arrastrada por el carrier; determinando que en 0.2 mL inoculados en el medio Löwestein-Jensen (Figura 8) se obtuvo un crecimiento de 2 cruces (++) . Este crecimiento indica que en esos 0.2 mL se tienen entre 100 a 200 UFC o sea que en los 10 mL que fue donde se colocó el carrier, la cantidad de bacterias arrastrada se encuentra entre 5000 a 10 000 UFC.

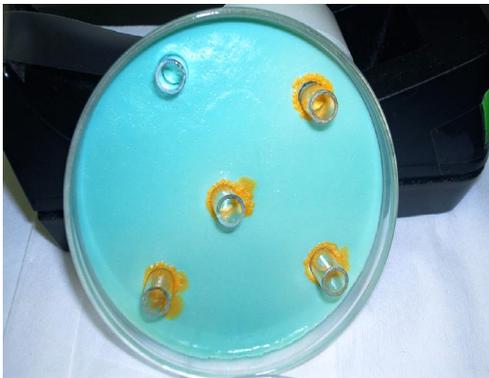


Figura 8: Análisis cualitativo de la cantidad de bacteria arrastrada por el carrier, en la parte superior izquierda se observa el control negativo.



Figura 9: Análisis cuantitativo de la cantidad de bacteria arrastrada por el carrier.

4.1.2 Cantidad de bacterias que permanecen en el desinfectante

Tras realizar la prueba para determinar si del carrier se están desprendiendo bacterias y permaneciendo en el desinfectante, se obtuvo que efectivamente del carrier se sueltan bacilos. La cantidad que se desprende del carrier y permanece en el químico es de aproximadamente 1500 UFC; sin embargo aunque se está dando este desprendimiento de bacilos, en el carrier permanece la mayoría de la población bacteriana transportada inicialmente.

4.1.3 Uso de neutralizantes

Se determinó que seis de los diez desinfectantes a utilizar requieren de un neutralizante adecuado. En estos seis desinfectantes no se presentó crecimiento de *Mycobacterium vaccae*, después de inocular 0.2 mL de un Mc Farland 1 a 10 mL de medio Middlebrook 7H9 que contenía un carrier previamente expuesto al desinfectante a evaluar. En el cuadro 5 se indica los desinfectantes que requieren neutralización.

Cuadro 5: Crecimiento de *M. vaccae* en presencia de carrier previamente colocado en la dilución mayor y menor de los desinfectantes.

| Desinfectante | Concentración utilizada | | Crecimiento en ambas concentraciones |
|---------------|-------------------------|--------|--------------------------------------|
| 1 | 1,0% | 10,0% | - |
| 2 | 4,0% | 12,0% | - |
| 3 | 10% | 25% | - |
| 4 | 10% | 25% | - |
| 5 | 1,0% | 2,5 % | - |
| 6 | 0.6% | 1.2% | + |
| 7 | 0.2% | 0.8% | + |
| 8 | 10 ppm | 40 ppm | - |
| 9 | 0.5% | 2.0% | + |
| 10 | 0.3% | 1.0% | + |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

(-) Desinfectantes en lo que se requiere un neutralizante adecuado.

4.1.4 Valoración de los Neutralizantes utilizados:

Como se observa en el cuadro 6 y 7 el efecto del Neutralizante 1 y 2 sobre los desinfectantes que así lo requerían no fue satisfactorio. Con el Neutralizante 1 no se neutralizó ninguno de los desinfectantes pues ni con la mayor ni menor dilución se presentó crecimiento (cuadro 6). En el cuadro 7 se observa el efecto del neutralizante 2, de los datos presentados se observa como sólo con el **desinfectante 1** a la concentración mayor y menor se neutralizó por completo los restos de desinfectante que puedan ser transportados por cada uno de los carrier, esto se evidenció debido al crecimiento de *M. vaccae*. Para el caso del desinfectante 5 y el 8, el neutralizante fue efectivo al usarlo con la solución de desinfectante a la menor concentración, sin embargo no funcionó a la mayor concentración. Los desinfectantes 2, 3 y 4 no se neutralizaron en ninguna de las diluciones.

Cuadro 6: Efecto del neutralizante 1, sobre la dilución mayor y menor de cada uno de los desinfectantes.

| Desinfectante | Concentración %(v/v) | | Crecimiento en ambas concentraciones |
|---------------|-------------------------|-----------------|---|
| 1 | 1 | 10 | - |
| 2 | 4 | 12 | - |
| 3 | 10 | 25 | - |
| 4 | 10 | 25 | - |
| 5 | 1 | 2,5 | - |
| 8 | 10 ^a | 40 ^a | - |

^a La concentración de dicho desinfectante está dada en ppm.

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

Cuadro 7: Efecto del neutralizante 2 utilizado, sobre la dilución mayor y menor de cada uno de los desinfectantes.

| Desinfectante | Concentración %(v/v) | | Crecimiento en Ambas concentraciones |
|---------------|-------------------------|-----------------|--|
| 1 | 1 | 10 | + |
| 2 | 4 | 12 | - |
| 3 | 10 | 25 | - |
| 4 | 10 | 25 | - |
| 5 | 1 | 2,5 | + para 1% - para 2,5% |
| 8 | 10 ^a | 40 ^a | + para 10 - para 40 |

^a La concentración de dicho desinfectante está dada en ppm.

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

Los controles realizados para determinar si los neutralizantes podrían afectar el crecimiento de la bacteria, evidencian que ninguno de los dos neutralizantes utilizados afectan el crecimiento de la misma.

4.2 Valoración de los desinfectantes.

4.2.1 Control negativo con fenol al 5%

Se observó que de los veinte carrier contaminados con bacteria, colocados en fenol al 5% por 10 minutos e inoculados en medio Middlebrook 7H9 por 7 días a 37 °C, nueve presentaron sedimento; surgió por tanto la necesidad de centrifugar los veinte tubos; y sembrar el precipitado en medio Löwestein Jensen. Tras 7 días de incubación en este medio a 37 °C, se observó que en ninguno de los veinte tubos existió crecimiento. El carrier contaminado con *M. vaccae* e inoculado en el medio Middlebrook 7H9, después de centrifugado y sembrado el precipitado en Löwestein Jensen estuvo positivo, lo cual evidencia la viabilidad de ambos medios y de la bacteria empleada en la prueba realizada.

4.2.2 Relación existente entre el sedimento formado en el medio Middlebrook 7H9 y el crecimiento obtenido en el medio Löwestein-Jensen.

Para determinar la relación entre el sedimento obtenido al inocular el carrier contaminado, expuesto a cada uno de los desinfectantes e inoculado en el medio Middlebrook 7H9 y la viabilidad o crecimiento de la bacteria, se realizó esta prueba. En la cual, solamente se contabilizaron los tubos utilizados con el desinfectante 6 y con el fenol al 5%. Se observó que con la dilución al 0.6% del desinfectante 6, ocho de los veinte tubos presentaron sedimento; sin embargo después de centrifugar e inocular en el medio Löwestein-Jensen, solamente un tubo mostró crecimiento. Para el caso de la dilución al 0.8%, 1.0% y 1.2% se obtuvo que en once, nueve y siete tubos se obtuvo sedimento respectivamente, sin embargo no hubo crecimiento en ninguno de los tubos en el medio Löwestein-Jensen; con el fenol al 5% se obtuvo que en nueve de los veinte carriers se presentó sedimento, no obstante después de haber centrifugado e inoculado dichos tubos en medio Löwestein-Jensen no se observó crecimiento alguno (ver cuadro 8).

Cuadro 8: Relación existente entre la presencia de sedimento en medio Middlebrook 7H9 y el crecimiento de *Mycobacterium vaccae* en medio Löwestein-Jensen.

| Desinfectante | Número de tubos en medio Middlebrook 7H9 con sedimento | Número de tubos con crecimiento en medio Löwestein-Jensen. |
|--------------------------|--|--|
| Desinfectante 6 al 0.6% | 8 | 1 |
| Desinfectante 6 al 0.8% | 11 | 0 |
| Desinfectante 6 al 1.0 % | 9 | 0 |
| Desinfectante 6 al 1.2 % | 7 | 0 |
| Fenol al 5% | 9 | 0 |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

Tras obtener el coeficiente de correlación, se observó que no existe relación entre la presencia de sedimentos en el medio Middlebrook 7H9 y la viabilidad de la bacteria.

Una vez que se determinó que los desinfectantes 6, 7, 9 y 10 no requerían neutralizantes, se procedió a realizar la prueba presuntiva de cada uno de ellos en sus respectivas diluciones.

4.2.3 Prueba presuntiva con *Mycobacterium vaccae* utilizando el desinfectante 6.

Las concentraciones utilizadas del **desinfectante 6**, demostraron que es efectivo contra *M. vaccae* al 0.8%, 1% y 1.2% tras 10 minutos de contacto. No así al 0.6% donde se presentó un crecimiento de (+++) en uno de los 20 tubos (cuadro 9). Dicho crecimiento indica la presencia de 200 a 500 colonias aproximadamente.

Cuadro 9: Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 6 contra *Mycobacterium vaccae* a una temperatura de 23 °C.

| Concentraciones del Desinfectante 6 utilizadas | Cantidad de tubos donde se presentó crecimiento | Cantidad de tubos donde no se presentó crecimiento |
|--|---|--|
| 0.6% | 1 | 19 |
| 0.8% | 0 | 20 |
| 1,0% | 0 | 20 |
| 1,2 % | 0 | 20 |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

Con los datos del cuadro anterior, se construyó el gráfico 1 el cual se representa el porcentaje de carriers donde se presentó muerte bacteriana; como se puede observar en dicho gráfico, al 0.8%, 1.0% y 1.2% se produce la muerte en el 100 % de los carrier que transporta la bacteria; se observa asimismo como con la dilución al 0.6% sólo se produce la muerte en el 95% de los carrier contaminados.

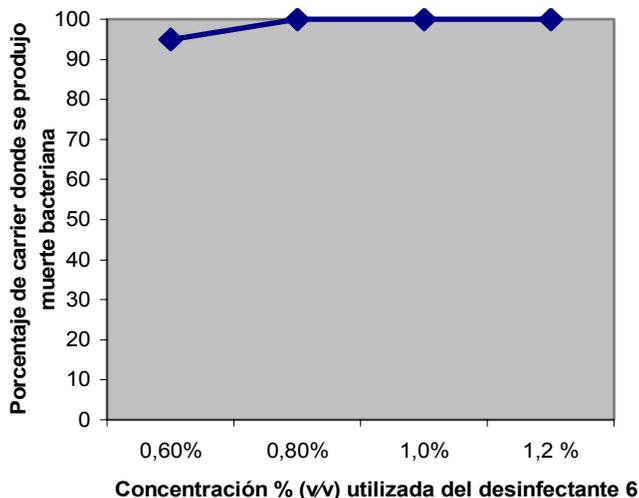


Gráfico 1: Porcentaje de carriers en los cuales se produjo la muerte de la totalidad de *Mycobacterium vaccae* al utilizar diferentes diluciones del Desinfectante 6.

4.2.4 Prueba presuntiva con *Mycobacterium vaccae* utilizando el desinfectante 7

Las concentraciones utilizadas del **desinfectante 7** fueron 0.2%; 0.4%, 0.6% y 0.8%; solamente con la dilución al 0.8 % no se presentó crecimiento en ninguno de los veinte tubos; con la dilución al 0.2% se obtuvo crecimiento de (+++) en once de los veinte tubos y en uno se contabilizaron once colonias (UFC) o sea que con esta dilución se presentó crecimiento en doce tubos; en los restantes ocho tubos no se determinó crecimiento de *Mycobacterium vaccae*. Al 0.4% el crecimiento se observó en tres de los veinte tubos; en dos de ellos el crecimiento fue de (+++) y en el restante crecieron dos colonias. Con respecto a la dilución al 0.6%, se observó un crecimiento de (+++) en dos de los veinte tubos. En el cuadro 10 se observa el efecto del **Desinfectante 7** a las diferentes concentraciones utilizadas con *Mycobacterium vaccae*.

Cuadro 10: Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 7 contra *Mycobacterium vaccae* a una temperatura de 23 °C.

| Concentraciones del Desinfectante 7 utilizadas | Cantidad de tubos donde se presentó crecimiento | Cantidad de tubos donde no se presentó crecimiento |
|--|---|--|
| 0.2% | 12 | 8 |
| 0.4% | 3 | 17 |
| 0.6% | 2 | 18 |
| 0.8% | 0 | 20 |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

En el gráfico 2 se puede observar que la dilución al 0.2% fue la menos efectiva pues sólo eliminó la bacteria arrastrada en el 40% de los carrier contaminados, así mismo las diluciones al 0.4% y 0.6% produjeron la muerte en el 85% y 90% de los carrier respectivamente. La única dilución que eliminó la bacteria arrastrada en el 100% de los carrier fue al 0.8%

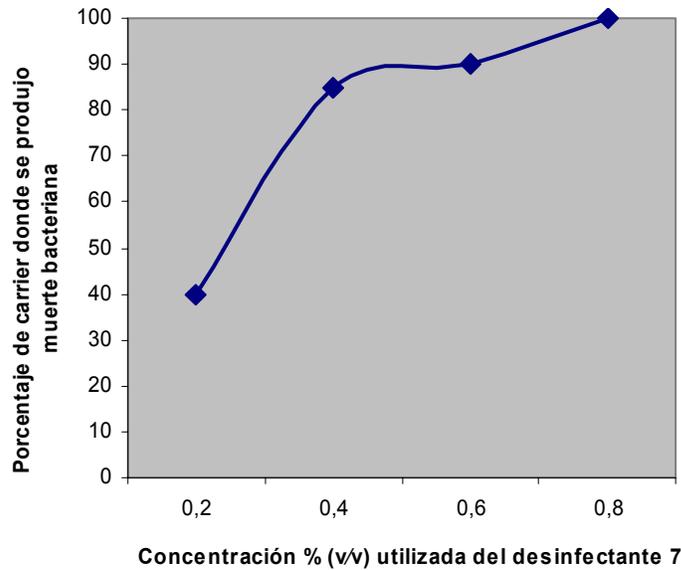


Gráfico 2: Porcentaje de carriers en los cuales se produjo la muerte de la totalidad de *Mycobacterium vaccae* arrastrada por los carriers, al utilizar diferentes diluciones del Desinfectante 7.

4.2.5 Prueba presuntiva con *Mycobacterium vaccae* utilizando el desinfectante 9

Las diluciones utilizadas del **desinfectante 9** (0.5%, 1%, 1.5% y 2%) evidencian que son efectivas contra *Mycobacterium vaccae* pues con ninguna de ellas se presentó crecimiento después del periodo de incubación (ver cuadro 8).

Cuadro 11: Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 9 contra *Mycobacterium vaccae* a una temperatura de 23 °C.

| Concentraciones del Desinfectante 9 utilizadas | Cantidad de tubos donde se presentó crecimiento | Cantidad de tubos donde no se presentó crecimiento |
|--|---|--|
| 0.5% | 0 | 20 |
| 1% | 0 | 20 |
| 1.5% | 0 | 20 |
| 2% | 0 | 20 |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

4.2.6 Prueba presuntiva con *Mycobacterium vaccae* utilizando el desinfectante 10

En dos de las diluciones utilizadas del Desinfectante 10 (0.3% y 0.5%) se presentó crecimiento en uno de los veinte tubos, dicho crecimiento fue de tres cruces (+++), por el contrario con la dilución al 0.8% y 1% no se presentó crecimiento en ninguno de los veinte tubos, evidenciando que estas diluciones son eficaces contra *Mycobacterium vaccae*. Los controles para determinar la viabilidad de la bacteria estuvieron positivos (Cuadro 12).

Cuadro 12: Resultados obtenidos al utilizar el Desinfectante 10 contra *Mycobacterium vaccae* a una temperatura de 23 °C.

| Concentraciones del Desinfectante 10 utilizadas | Cantidad de tubos donde se presentó crecimiento | Cantidad de tubos donde no se presentó crecimiento |
|---|---|--|
| 0.3% | 1 | 19 |
| 0.5% | 1 | 19 |
| 0.8% | 0 | 20 |
| 1% | 0 | 20 |

Fuente: CNRTB, INCIENSA. 2003.

En el gráfico 4 se observa como sólo con las diluciones del desinfectante 10 al 0.8% y 1% se produce la muerte en el 100% de los carriers utilizados, no así con la dilución al 0.3% y 0.5% en donde sólo se produjo la muerte en el 95% de los carriers.

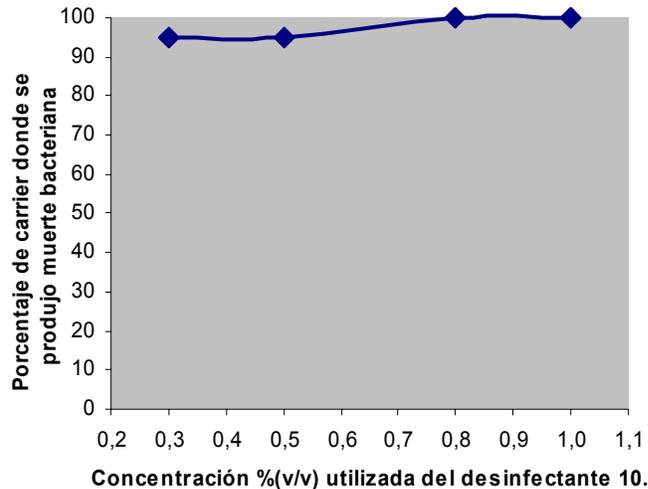


Gráfico 4: Porcentaje de carriers en los cuales se produjo la muerte de la totalidad de *Mycobacterium vaccae* al utilizar diferentes diluciones del desinfectante 10.

En la evaluación presuntiva de los desinfectantes 6, 7, 9 y 10, se controló la esterilidad de los medios (Middlebrook 7H9 y Löwestein-Jensen), así como los carriers utilizados, resultando en todos los casos negativos y asegurando de este modo la esterilidad de los mismos. También se controló la viabilidad de la bacteria, en la figura 9 se observa la turbidez obtenida al colocar un carrier contaminado en el medio Middlebrook 7H9 después de 7 días de incubación a 37 ° C, se compara con un tubo en el cual no existe crecimiento debido a que se colocó un carrier estéril.



Figura 10: Control de viabilidad de la bacteria (izquierda), control de esterilidad del medio y del carrier (derecha).

En el presente estudio se evaluó la acción bactericida de diez desinfectantes contra *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando la técnica Standard de la AOAC 965.12. Este método recomienda hacer pruebas presuntivas con una micobacteria no patógena y confirmatorias empleando *M. tuberculosis*. En este estudio sólo se realizaron las pruebas presuntivas. Por otro lado, fue necesario optimizar este método de acuerdo a las facilidades con que disponía el Centro Nacional de Referencia para la Tuberculosis (CNRTB) en el INCIENSA.

En la actualidad en los laboratorios de la red nacional y en el CNRTB se utilizan como desinfectantes el fenol al 2.5% y el cloro al 3% para las áreas donde se trabaja con micobacterias. El primero es sumamente tóxico para el ser humano (NIOSH, 1976) y el segundo muy corrosivo (Crawford *et al.* 2000). Por lo tanto, es de suma importancia evaluar la acción bactericida de otros desinfectantes que puedan sustituir a los ya mencionados.

De los diez desinfectantes evaluados, cuatro se utilizaron en la prueba presuntiva (desinfectante 6, 7, 9 y 10) debido a que no requirieron ser neutralizados, los seis restantes no se pudieron evaluar pues era necesario encontrar un neutralizante adecuado. Se utilizaron controles para verificar la validez de cada uno de los procesos, además se hicieron modificaciones en el método para adecuar la técnica a las condiciones del laboratorio.

Los desinfectantes #6 y #7 son derivados fenólicos, con composición química similar. Block (1983), indica que los compuestos fenólicos han sido considerados altamente efectivos contra *M. tuberculosis*, sin embargo es necesario determinar a nivel experimental el funcionamiento de estos. La concentración del desinfectante #6 sugerida contra *Mycobacterium tuberculosis* por los fabricantes es 0.8%. Las diluciones utilizadas fueron 0.6%, 0.8%, 1% y 1.2%. Todas demostraron ser efectivas contra *M. vaccae* excepto 0.6%. Se recomienda utilizar en la prueba confirmatoria las diluciones que fueron efectivas. Por otro lado, el desinfectante #7 es recomendado contra *M. tuberculosis* al 0.4%, por lo que se utilizaron las diluciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8%. Bajo las condiciones de trabajo utilizadas las diluciones 0.4 y 0.6 % sólo eliminaron las bacterias arrastradas en el 85 y 90% de los carriers respectivamente. La única dilución efectiva en el 100% de los carriers, fue 0.8% y es la recomendada para utilizar en la prueba confirmatoria contra *Mycobacterium tuberculosis*.

El desinfectante #9 cuya composición química es alcohol de 70 ° y yodo al 0.5%, 1%, 1.5% y 2%, demostró ser efectivo en todas las concentraciones utilizadas, por lo tanto se deberán evaluar en la prueba confirmatoria contra *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, según Mejía (2003) éste desinfectante es efectivo contra *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración del 2%. Por el contrario, Block (1983) señala que estudios anteriores han demostrado que una

solución de yodo al 1% en alcohol de 70° ha sido efectivo para eliminar el bacilo de la tuberculosis en termómetros. Prescott *et al.* (1999) señala que el alcohol yodado es un microbicida de acción rápida, sin embargo presenta el inconveniente de que es corrosivo y además tiñe e irrita la piel; características que se deben de tomar en cuenta a la hora de elegir un desinfectante. Además es, importante mencionar que este desinfectante es fotosensible, por lo que debe mantenerse en recipientes que lo protejan de la luz y bien tapados, para evitar que por evaporación o alteración debidas a la luz se modifiquen las concentraciones iniciales.

El desinfectante #10 que consiste en hipoclorito de sodio industrial al 12%, demostró ser eficiente contra *Mycobacterium vaccae* al 0.8% y 1%, no así al 0.3% ni al 0.5%; por tanto se recomienda realizar la prueba confirmatoria con las dos primeras diluciones mencionadas. En un estudio realizado por León *et al.* (2002) se encontró que para eliminar el 100% de bacterias no tuberculosas se requería una concentración al 0.5% durante 15 minutos. En el presente estudio el tiempo de contacto fue de 10 minutos por lo que es de esperarse que se requiera una mayor concentración para eliminar *M. vaccae*. El cloro ejerce una buena acción contra *Mycobacterium vaccae* a bajas concentraciones; Montero (2003) señala que soluciones de hipoclorito de sodio entre 5.25% y 10% son efectivas contra micobacterias, sin embargo la corrosión que pueda generar una solución a estas concentraciones sería mayor, es por ello que se busca evaluar concentraciones menores que ofrezcan eficacia en la eliminación de *M. tuberculosis*. Crawford *et al.* (2000) señalan que una solución de hipoclorito de sodio al 0.53% causa corrosión en superficies de metal después de un contacto de 24 horas. Así mismo se presentan daños significativos después de 11 días de contacto con dicho desinfectante. Dos aspectos importantes de las soluciones de hipoclorito de sodio son:

- se deben preparar cada 24 horas, para que así conserven sus propiedades bactericidas,
- se deben almacenar en envases no transparentes

Siempre se debe tener en cuenta que la efectividad de los desinfectantes depende de una serie de factores como son la temperatura, pH y presencia de materia orgánica. Los desinfectantes evaluados en el presente estudio, se evaluaron en condiciones óptimas de trabajo, es decir en ausencia de materia orgánica u otras sustancias que pudieran intervenir en la acción del desinfectante. Se deben evaluar las concentraciones de los desinfectantes que resultaron eficientes contra *Mycobacterium vaccae* bajo estas condiciones y determinar así en cuanto disminuye la eficiencia al existir otras sustancias.

La neutralización a la hora de evaluar un desinfectante es un punto crucial, pues con esto se asegura que al transcurrir los 10 minutos de contacto entre cada uno de los desinfectantes y el respectivo carrier contaminado, se detiene la acción bactericida del químico que se está probando. Pelczar & Chan (1981) mencionan que una gran cantidad de desinfectantes detienen su actividad al entrar en contacto con materia orgánica o detergentes, los cuales hacen que el

desinfectante quede inactivado, precisamente esa es la función de los de los neutralizantes recomendados.

En este estudio se realizó una prueba para conocer los desinfectantes que debían ser neutralizados. Se observó que los desinfectantes 1, 2, 3, 4, 5 y 8 lo requerían, debido a que una vez utilizados no se presentó crecimiento después de que se inoculara 0.2 mL de una suspensión de *Mycobacterium vaccae*, en un tubo que contenía un carrier previamente expuesto a la dilución máxima y mínima de cada uno de los desinfectantes a evaluar. Este hecho indica que la cantidad de desinfectante arrastrada por el carrier, inhibió el crecimiento de las bacterias inoculadas. Si estos desinfectantes se utilizaran sin neutralizar, las bacterias arrastradas por el carrier no crecerían pero no porque necesariamente las haya eliminado sino porque se está inhibiendo el crecimiento o sea el desinfectante estaría actuando como bacteriostático. Boyd (1984) menciona que a bajas concentraciones, la mayoría de los desinfectantes actúan inhibiendo el crecimiento de las bacterias, así mismo que a concentraciones superiores a las requeridas para eliminar a las bacterias.

Los neutralizantes utilizados en el presente estudio son sugeridos por la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), sin embargo en las concentraciones utilizadas no brindaron una neutralización adecuada. Es necesario realizar otras pruebas a otras concentraciones, para poder determinar las adecuadas para una buena neutralización. La cantidad de lecitina y polisorbato 80 utilizados en la preparación del neutralizante 1 y 2, es adecuada pues se disolvieron bien. Por otro lado, la AOAC sugiere hacer una solución madre de polisorbato 80 al 28% y de lecitina al 4% entre otros compuestos. El polisorbato 80 es un éster del ácido oleico, un detergente no iónico que no tiene actividad antimicrobiana, sin embargo es bastante viscoso, lo que lo hace poco soluble en agua. Por su parte, la lecitina es un fosfolípido que como mencionan Madigan et al. (1999) son lípidos complejos y juegan un papel estructural muy importante en la membrana citoplasmática.

La composición de los neutralizantes utilizados 1 y 2 no afecta el crecimiento de *Mycobacterium vaccae*, al contrario el tween 80 o polisorbato se utilizan en medios líquidos de crecimiento de micobacterias para evitar que estas crezcan en forma de películas duras en la superficie del medio, evitar la formación de grumos y así favorecer el crecimiento disperso de las bacterias (Stanier et al. 1986; Jañez, 1998; Draper, 1998). Este último autor señala además que el ácido oleico puede estimular el crecimiento. El hecho de que los neutralizantes utilizados no afectan el crecimiento en forma negativa, se comprobó al colocar un carrier contaminado en el medio Middlebrook 7H9 que contenía el neutralizante a evaluar, se observó crecimiento normal.

Otros aspectos que era necesario probar antes de iniciar la prueba presuntiva, fueron los siguientes:

- cantidad de bacterias que arrastra el carrier
- cantidad de bacterias que permanece en el desinfectante después del contacto de 10 minutos de éste con cada uno de los carriers.

La cantidad de bacterias que arrastra el carrier, se encuentra entre 5000 a 10000 UFC, sin embargo al ser este un rango amplio, hubiese sido de mucha ayuda determinar un aproximado de la cantidad de bacteria arrastrada por cada uno de los carriers. Para estudios futuros se recomienda probar diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} a partir del medio Middlebrook 7H9 con el carrier contaminado, en al menos 10 carriers.

Otro aspecto comprobado es la cantidad de bacteria que permanece en el desinfectante, Prescott, *et al.* (1999) y Boyd (1984) mencionan que entre menos células bacterianas se tengan, menos tiempo se va a requerir para eliminarla. Por lo tanto, era importante determinar la cantidad de bacteria que permanece en el desinfectante después de colocar el carrier contaminado durante 10 minutos, pues podría ser que el desprendimiento de bacterias fuera tal que al final del experimento se observara una eliminación total de las bacterias. Esto no significaba que el desinfectante eliminaba la bacteria, sino más bien que gran cantidad de la bacteria estaba quedando en el desinfectante. Se determinó así que la cantidad de bacteria que quedó en el desinfectante es de aproximadamente 1500 UFC indicando que aunque se hallan desprendido, en el carrier permanece la mayoría de las bacterias transportadas.

Por otro lado, el fenol al 5% utilizado como control positivo del método, evidenció que la cantidad de bacteria arrastrada es adecuada y puede ser destruida por este desinfectante. Sin embargo después de los 7 días de incubación en el medio Middlebrook 7H9, se observó un sedimento en nueve de los veinte tubos. Se hizo necesario determinar si éste representaba bacterias viables ó más bien era resultado de la forma en que el fenol actúa sobre las bacterias. Tras centrifugar los tubos que presentaban precipitado se inocularon en medio Löwestein-Jensen durante 7 días a 37 ° C. No se observó crecimiento en ninguno de los veinte tubos. Se demuestra así, que la presencia de sedimentos en los tubos al final de la prueba, no significa que la bacteria esté viable. Esto también se confirmó con el desinfectante 6.

Todos los controles establecidos durante el estudio demostraron que tanto los medios de cultivo utilizados (Middlebrook 7H9 y Löwestein-Jensen) como los carriers, estaban estériles. La viabilidad de la bacteria en cada uno de los experimentos realizados también se controló y se obtuvo *Mycobacterium vaccae* viable y podía por lo tanto crecer en las condiciones óptimas a las que se mantenía. Aunque los carriers utilizados son de vidrio de borosilicato y los sugeridos por el método son de porcelana, se comprobó que los carriers transportaban la bacteria en forma eficiente.

El método utilizado en el estudio determina que un desinfectante es efectivo contra *Mycobacterium tuberculosis* sólo cuando éste elimine el cien por ciento de la bacteria arrastrada en la totalidad de carriers evaluados, lo cual sería una ventaja en términos de seguridad. Sin embargo presenta algunos inconvenientes, entre los cuales se pueden mencionar: la falta de los carriers de porcelana, la necesidad de neutralizar los desinfectantes que presentan acción bacteriostática, así como que los neutralizantes sugeridos por la AOAC son de difícil manejo en la práctica.

En este estudio se sustituyó *Mycobacterium smegmatis* por *Mycobacterium vaccae*, esto debido a que el crecimiento de la primera, se da en forma de grumos, que son de difícil manejo. Para poder colocar los carrier en una suspensión bacteriana se tendría que homogenizar cada uno de dichos grumos, lo cual en la práctica es bastante difícil. *Mycobacterium vaccae* es una micobacteria saprófita, de crecimiento rápido, características deseables al realizar la prueba presuntiva pues así se acorta el tiempo para obtener resultados y a la vez se reduce el riesgo biológico al realizar cada una de las pruebas.

La sustitución del medio Proskauer-Beck por el medio Middlebrook 7H9 se debió a que el primero después de regularle el pH entre 7.2 a 7.4 con NaOH 1 N y autoclavar, tomaba una apariencia lechosa, que interfirió a la hora de medir la tramitancia para ajustar la concentración de bacterias.

Varios autores mencionan la posibilidad de sustituir *Mycobacterium tuberculosis* por otras micobacterias que ofrezcan mayor resistencia a los desinfectantes y que a la vez no sean patógenas. En un estudio realizado por Griffiths *et al.* (1998) encontraron que de tres micobacterias evaluadas: *M. tuberculosis*, *M. avium intracelulare* y *M. terrae*; la segunda es la que ofrece mayor resistencia. Ligeramente más resistente que *M. tuberculosis* se encontró a *M. terrae*, la cual posee como ventaja que no es un patógeno tipo 3. León *et al.* (2002) comentan que ni *M. tuberculosis* ni *M. smegmatis* deberían de utilizarse como organismos indicadores debido a la sensibilidad que estas poseen frente a los desinfectantes, al igual que Griffiths *et al.* (1998) León *et al.* (2002) comentan la posibilidad de utilizar *M. terrae* en lugar de *M. tuberculosis*, además de utilizar otra micobacteria como *M. gordonae* la cual ha demostrado tener mayor resistencia a los desinfectantes.

Es crucial evaluar los desinfectantes que resultaron efectivos contra *Mycobacterium vaccae* del presente estudio en la prueba confirmativa, con el fin de obtener aquellos desinfectantes que sean efectivos contra *Mycobacterium tuberculosis* y así poder utilizarlos en el Centro de Referencia para la Tuberculosis (CNRTB) como en los otros laboratorios de la red nacional.

Entre las principales conclusiones a las que se llega con el presente estudio se tienen las siguientes:

- Las diluciones a las cuales el desinfectante fenólico (6) fue efectivo son 0.8%, 1% y 1.2% (se evaluarán en la prueba confirmativa). Se descarta la dilución al 0.6% pues no fue efectiva contra *Mycobacterium vaccae*.
- El desinfectante fenólico (7) sólo fue efectivo con la dilución al 0.8%, las diluciones al 0.2%, 0.4% y 0.6% se descartan para la prueba confirmativa.
- El desinfectante 9 (alcohol yodado) fue el único que mostró ser efectivo contra *M. vaccae* en todas las diluciones evaluadas (0.5%, 1%, 1.5% y 2%).
- El desinfectante 10 (hipoclorito de sodio) 10 fue efectivo únicamente con la dilución al 0.8% y 1%, se descartan la dilución al 0.3% y 0.5%.
- Ventajas del método Estándar de la AOAC utilizado:
 - Establece que el desinfectante efectivo elimina el 100% de las bacterias
- Desventajas:
 - No disponibilidad de carriers de porcelana
 - Necesidad de neutralizar los desinfectantes
 - La concentración de neutralizantes sugerida por la AOAC no es práctica
- La presencia de sedimentos en los tubos donde se inocula el carrier contaminado y tratado con los desinfectantes, no indica necesariamente viabilidad de la bacteria.
- Al colocar el carrier en el desinfectante a evaluar, se desprenden bacterias, sin embargo en él permanece la mayoría de la población bacteriana transportada inicialmente
- Es necesario realizar la prueba confirmativa a partir de los resultados obtenidos en la prueba presuntiva o sea todos los desinfectantes que resultaron efectivos contra *Mycobacterium vaccae* deben ser evaluados contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- Es importante repetir la prueba presuntiva con los desinfectantes ya evaluados, con el fin de determinar la reproducibilidad del método.
- Evaluar otras concentraciones del neutralizante (ie. 15 % v/v y 20% v/v), así como otros neutralizantes.

1. ANDREU, N. 1999. Tuberculosis, Breve descripción de la enfermedad y del agente causal: *Mycobacterium tuberculosis* (en línea). Consultado el 26 de agosto 2003. Disponible en: <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs99-00/Andreu/>
2. ANDREWS, W. 1992. Manual of food quality control 4. Rev.1. microbiological analysis. Food and Agriculture organization of the united nations. Roma, Italia.
3. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC international. 16 Ed. Volumen I. Virginia, Estados Unidos de América.
4. AUCCASI, M. 1999. Principios de Desinfección y Esterilización en línea). Consultado el 05 de junio 2003. Disponible en: <http://usuarios.lycos.es/enfermeriaperu/mistrabajos/prindesinfeccion.htm>
5. BERNARD, D; DULBECCO, R; EISEN, H; GINSBERG, H; WOOD, W. 1968. Microbiology. Estados Unidos, Harper & Row Publishers, 1464p.
6. BERKELEY LAB. Sf. Biosafety program (en línea). Consultado el 05 de junio 2003. Disponible en: http://www.lbl.gov/ehs/biosafety/Biosafety_Manual/html/decontamination.shtml
7. BLOCK, S.1983. Disinfection, Sterilization and Preservation. 3 Ed. Estados Unidos de América. Editorial Lea & Febiger. 1053 p.
8. BOYD, R. 1984. General Microbiology. Estados Unidos de América. Editorial Library of Congress. 807 p
9. BRENES, M; CASTRO, B; VEGA, M. 1986. Evaluación de 6 desinfectantes de uso domestico mediante las técnicas del coeficiente fenol y dilución en uso. Tesis Lic. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 64 p.
10. BROOKS, G; BUTEL, J; ORNSTON, L; JAVWTZ, E; MELNICK, J; ADELBERG, E. 1992. Microbiología Médica. México, DF. Editorial el Manual Moderno, S.A. 700 p.
11. BURTON, K; WILLIAMS, R. 1971. Microbiología. México, D.F. Editorial Publicaciones Cultural. 830 p.
12. CAMINERO, J. 2003. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER). París, Francia. 389 p.

13. CAMINERO, J; MEDINA, M; RODRIGUEZ, F; CABRERA, P. 1998. Tuberculosis y Otras Micobacterias. Tratado de neumología y cirugía torácica. Sección de Neumología, Hospital Universitario Nuestra Señora del Pino. Edimpsa. Madrid, España.
14. CASAL, M; GUERRERO, A; MARTÍN, N; MORENO, S; NOGALES M. 1999. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por micobacterias (en línea). Consultado el 5 setiembre de 2003. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap9.htm>
15. COMITE DE SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA HARVARD MEDICAL SCHOOL. 2001. Methods of Decontamination from Michigan State University (en línea). Consultado el 05 de junio de 2003. Disponible en: <http://www.hms.harvard.edu/orsp/coms/Disinfection/Heat>.
16. CRAWFORD, L; YU, Z; KEEGAN, E; YU, T. 2000. A Comparison of Commonly Used Surface Disinfectants Alcohol-, Phenol-, Chlorine-, and Quaternary Amine-Based Disinfectants (en línea). Consultado el 7 agosto 2003. Disponible en: <http://www.infectioncontroltoday.com/articles/0b1feat2.html>
17. DRAPER, P. 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers (en línea). Consultado el 7 setiembre 2003. Disponible en: www.bioscience.org/1998/v3/d/draper/5.htm.
18. DAFFÉ, M; DRAPER, P. 1998. The envelope layers of Mycobacteria with reference to their pathogenicity. Advances in Microbial Physiology. California, Estados Unidos. Editorial Academic Press.
19. FINEGOLD, S; MARIN,W. 1983. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina. Editorial Medica Panamericana S.A. 670p
20. FORBES, B; SAHIM,D; WEISSFELD,A. 1998. Diagnostic Microbiology. Editorial Mosby, Estados Unidos. 1074p.
21. GARCIA, V. 1995. Introducción a la Microbiología. San José, Costa Rica. Editorial Euned. 251 p
22. GRIFFITHS, P; BABB, J; FRAISE, A. 1998. Mycobacterium terrae: a potential surrogate for Mycobacterium tuberculosis in a standard disinfectant test (en línea). Consultado el 15 octubre 2003. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&list_uids=9561469&dopt=Abstract
23. HARRIES, A; MAHER, D; RAVIGLIONE, M; CHAULET, P; NUMM, P; LUELMO; VAN E. 1997. TB/VIH. Manual Clínico para América Latina. Organización Mundial de la Salud. Italia. Editorial Tipolitografia Botalla. 150p.

24. IAÑEZ, E. 1998. Acción de los Agentes Químicos sobre las bacterias(en línea). Consultado el 05 junio 2003. Disponible en: http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/19_Micro.htm.
25. LEÓN, CL; PARDO, Y; RAMÍREZ, CL. 2002. Micobacterias no tuberculosas asociadas al VIH en Colombia (en línea). Revista Biomédica Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 22(2). Consultado el 05 de junio 2003. Disponible en: http://www.ins.gov.co/publicaciones/2002_biomedica_222.pdf
26. MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J. 1999. Biología de los Microorganismos. Trad por Mariano Gacto Fernández. 8 Ed. Iberia. España, Editorial Prentice Hall, 985 p.
27. MANCILLA, R. 1998. Departamento de Inmunología: Descifran el Código Genético del Bacilo de Koch (en línea). Consultado el 06 junio 2003. Disponible en <http://www.biomedicas.unam.mx/html/gaceta98/jun1.htm>
28. MATA, Z; OBANDO, J. 2002. Informe de actividades, Cuatrienio 1999-2002. Programa Nacional para la vigilancia y el Control de la tuberculosis. Caja Costarricense del Seguro Social y Ministerio de Salud, San José. Costa Rica, 21p.
29. MONTERO, V. 2003. Folleto de Microbiología Industrial. Cartago, CR, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 122 p.
30. NIOSH. 1976. Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Phenol (en línea). Consultado el 10 junio 2003. Disponible en: www.edc.gov/niosh/76-196.html
31. PELCZAR, M; CHAN, E. 1981. Elementos de Microbiología. México. DF, Editorial Mc Graw-Hill, 745 p.
32. PRESCOOT, L; HARLEY, J; KLEIN, D. 1999. Microbiología. 4 Ed. Madrid, España, Editorial Mc Graw-Hill, 1005p
33. RIVAS, C. 2002. Tuberculosis, CHLA-EP laboratorio. Montevideo Uruguay (en línea). Consultado el 05 de junio 2003. Disponible en: http://www.higiene.edu.uy/cefa/bacto/tbcurso/TBcurso%20bacteriologia%202002_archivos/frame.htm.
34. STANIER, R; ADELBERG, E; INGRHAM, J. 1986. Microbiología. México, DF. Editorial Reverté, 836p.

ANEXOS

Anexo 1: Método oficial de la AOAC 965.12 (Tuberculocidal Activity of Disinfectants). Prueba presuntiva

I Presumptive in vitro screening test using *Mycobacterium smegmatis*

A. Reagents

a) Test organism *Mycobacterium smegmatis* (PRD No 1) (available from Microbiology Lab, U.S. Environmental Protection Agency, Biological and Economic Analysis Div, Bldg 306, BARC-East, Beltsville, MD 20705). Maintain on nutrient agar slats by monthly transfers. Incubate new stock transfer 2 days at 37 °C; then store at 2-5 °C. From stock culture inoculate tubes of Proskauer-Beck broth. B)(1), incubate 48 h cultures in slating position, carry 30 days, using 48 h transfers, and use these 48 h cultures to start test cultures. Inoculate 1 or 2 tubes of Proskauer-Beck broth. Incubate 6-7 days at 37 °C. Incubate tubes 48 h in slating position to provide maximum surface aeration and then in upright position 4-5 days. Add 1.5 mL sterile 2% Bacto Gelatin solution and homogenize culture with sterilized glass tissue grinder. Adjust to 20% T at 650 nm with sterile Proskauer-Beck broth for use in testing.

b) Culture media (1) Modified Proskauer-Beck broth. Dissolve 2.5 g KH₂PO₄, 5 g asparagine, 0.6 g MgSO₄, 2.5 g magnesium citrate, 20 mL glycerol, 0.0046 g FeCl₃ and 0.001 g ZnSO₄·7H₂O in 1 L H₂O. Adjust pH 7.2-7.4 with 1N NaOH. Filter through paper, place 10 mL portions in separate 20x150 mm tubes, and sterilize 20 min at 121 °C. Use for propagating 48 h test starter cultures and 6-7 days test cultures.

(2) Subcultura media: Use (1) with addition of suitable neutralizing agents such as purified lecithin or sodium thioglycolate, where necessary.

(3) Nutrient agar: Prepare as in 955.11A(c). Use to maintain stock culture.

B. Apparatus

(a) Glassware, Petri dishes, water bath, transfer loops and wire hook.

(b) carriers

C. Operating technique

Transfer 20 sterile Penicylinder carriers, using flamed nichrome wire hook, into 20 mL 6-7 day homogenized standardized broth culture in sterile 25x150mm test tube. After 15 min contact, remove cylinders and place on end in vertical position in sterile Petri dish matted with filter paper. Cover and place in incubator at 37 C and let dry ≥ 20 min but ≤ 60 min. This will provide dried test carriers in groups of 20 in individual Petri dishes. With each group of 20 carriers, add 1 dried cylinder at 30 s intervals to each of 20 tubes containing 10 mL dilution of germicide to be tested. Transfer carrier to 10 mL subculture media. Shake all subculture tubes thoroughly and incubate 12 days at 37 C. Report results as + (growth) or - (no growth). Where there is reason to suspect that results may be affected by bacteriostatic action of antibacterial chemical carried over in subculture tubes, use suitable neutralizer in subculture media.

Para prueba confirmatoria ver Official Methods of Analysis of AOAC international. 1995.

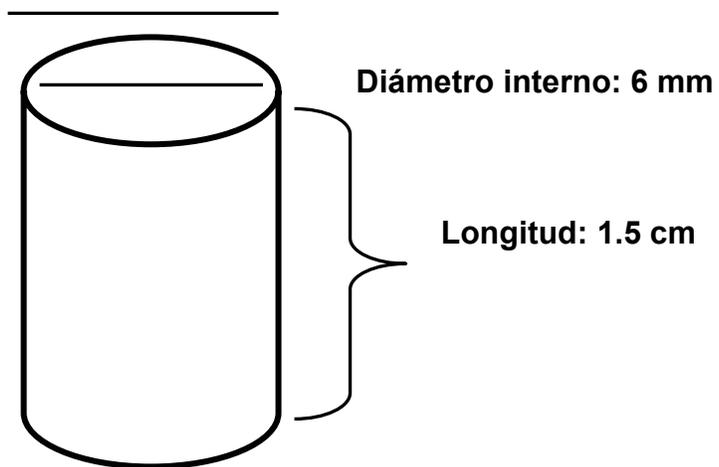
Anexo 2: Solución de alcohol yodado al 2%. Tomado de (Andrews, W. 1992. Manual of food quality control 4. Rev.1. microbiological analysis).

| Sustancia | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Ioduro de potasio | 10 g |
| Yodo | 10 g |
| Etanol al 70% | 500 mL |



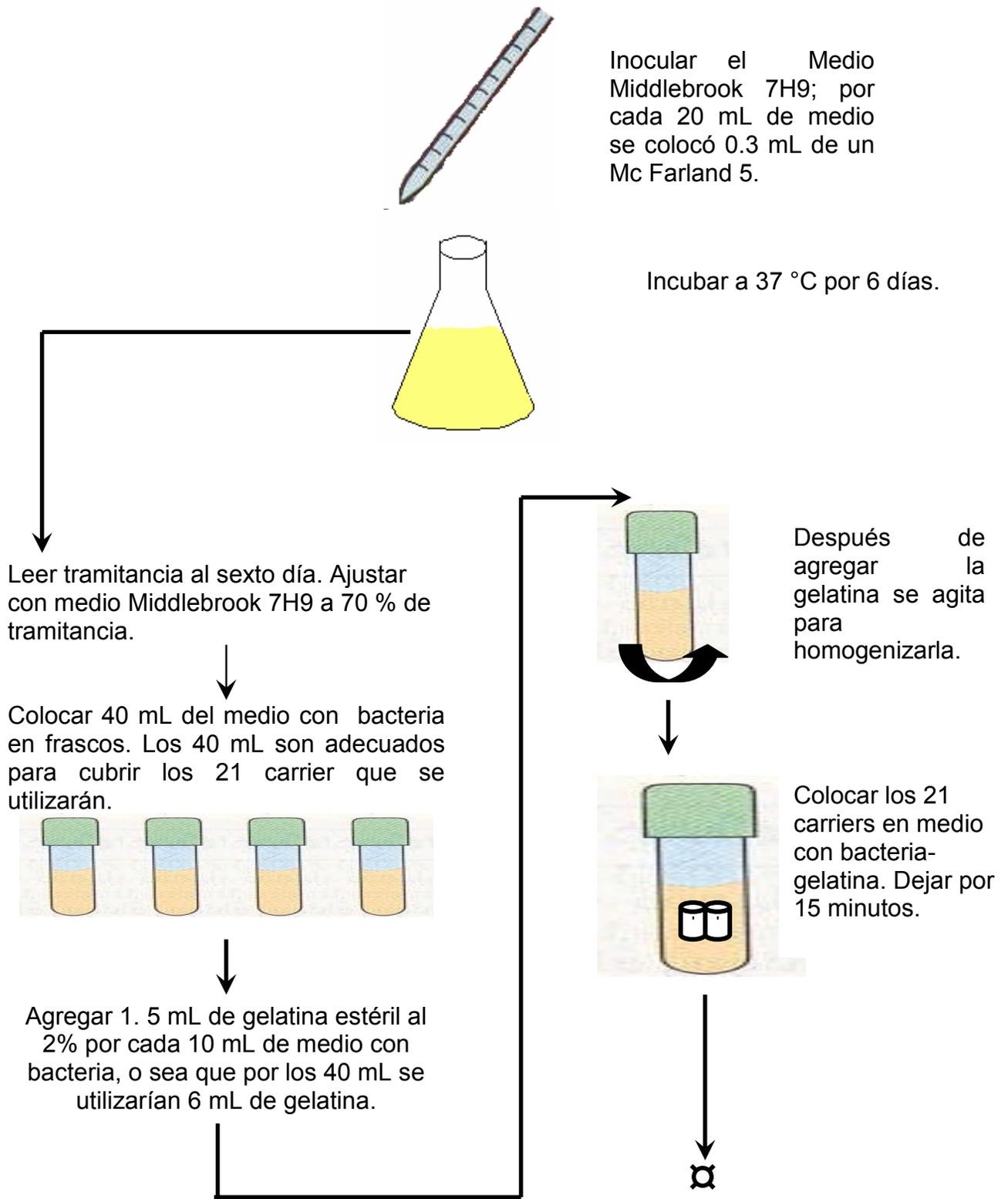
Anexo 3: Carriers utilizados en la evaluación de los desinfectantes.

Diámetro externo: 8 mm



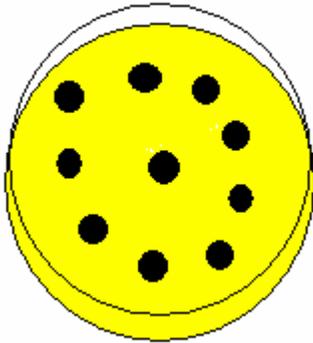
Anexo 4: Dimensiones de los carrier utilizados.

Anexo 5: Prueba presuntiva para la evaluación de los desinfectantes.



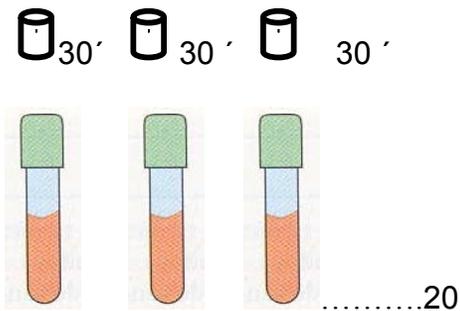


Trascurridos los 15 minutos, sacar los 21 carriers y colocarlos en posición vertical en placa Petri cubierta con papel filtro estéril. Si algún carrier se vuelca, se elimina.



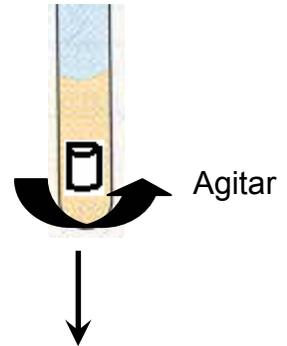
Incubar a 37 ° C durante 45 minutos.

Con la ayuda de una pinza estéril, tomar con cuidado cada uno de los 20 carrier y colocarlos a intervalos de 30 segundos en los 20 tubos que contienen 10 mL de la solución del desinfectante a probar.



Al colocar el carrier 20, habrán transcurrido 9 minutos con 30 segundos. Se esperará 30 segundos más y se empezarán a sacar los carriers de la solución de desinfectante igualmente a intervalos de 30 segundos.

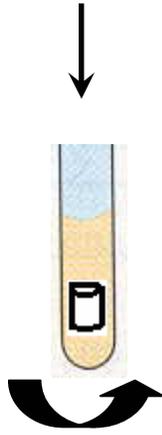
Se empiezan a sacar los carriers de la solución del desinfectante, se drena el exceso de desinfectante y se colocan en medio Middlebrook 7H9.



Incubar por 7 días a 37 ° C.

El carrier restante se coloca en medio Middlebrook 7H9 y funciona como control.

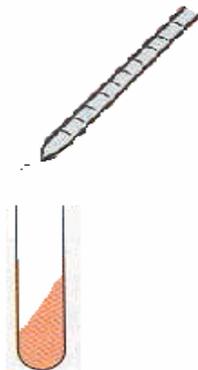
Transcurridos los 7 días se toman los 20 tubos, más el control y se agitan en vortex.



Se trasvasa el medio a un tubo cónico de 25 mL para centrifuga. Centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.

Eliminar sobrenadante y resuspender precipitado en 0.2 mL de agua destilada estéril.

Inocular los 0.2 mL en medio Löwestein-Jensen, en incubar por 7 días a 37 °C.



Si existe crecimiento:
< 50 (anotar número)
(+): 50-100 colonias.
(++): 100-200 colonias.
(+++): 200-500 colonias

Ausencia colonias (-)