



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Efecto microbiológico de dos desinfectantes y esterilizantes con
esporas bacterianas, evidenciado por el método colorimétrico de
Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

JULIA SOLANO MARTIN

ASESOR DE TESIS: Dra. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

COASESOR: M. en C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Gracias por permitir que se cumpla este sueño, por darme las fuerzas para seguir adelante, por rodearme de personas tan maravillosas y sobre todo por siempre estar presente en mi vida y en mi corazón.

A mis Amores

Mi hijo Oscar

Gracias por ser ese pequeñito que me dio las fuerzas para seguir adelante, por llegar a mi vida en el mejor momento, Tú has sido una gran inspiración y motivación para terminar este trabajo y espero que cuando tu leas estas líneas sepas que todo esto es por ti y recuerda siempre que NUNCA es tarde, jamás te rindas, no te des por vencido y siempre lucha por lo que quieres

TE AMO HIJO.

Mi esposo Francisco

Gracias por ser mi compañero incondicional, por ser la persona que eres, por darme esos empujones, por alentarme a jamás darme por vencida y sobre todo por creer en mí, Gracias por tu amor, tu comprensión, Muchas gracias por tu apoyo incondicional y por echarme esas porras que siempre me motivaban a seguir adelante y sobre todo por compartir tu vida a mi lado. Eres una gran persona amorcito una gran muestra de que el querer es poder. Eres un gran guerrero!!!!

TE AMO.

Con gran admiración y respeto A mis Padres

Mi papá Margarito (†)

Que a pesar de su ausencia, se que desde donde el esta, está muy contento y orgulloso de mi Gracias por esas palabras que se quedaron grabadas en mi y por todos los sacrificios que hizo para hacer de nosotros unas personas de bien.

A mi mamá Anastasia

Gracias por estar a mi lado, por ser una gran guerrera, una mujer bien luchona, por hacer todo lo que estuvo a sus posibilidades para sacarnos adelante, Por nunca rendirse y por enseñarme que la vida tiene que seguir con sus altas y bajas, pero siempre para adelante. Todos tenemos diferentes maneras de querer y aunque la mía sea muy diferente sepa usted que yo la amo mucho, es un gran ejemplo de vida mamita

A mis hermanas y hermano.

Alberto (†)

Gracias por formar parte de mi vida, hoy tu ausencia nos pesa y te extrañamos mucho hermanito, pero Dios jamás se equivoca, me hubiera encantado que estuvieras presente, pero sé que lo estas!! Papá y tú siempre nos cuidan, Gracias por tu apoyo brindado, por tus consejos, por tu amor y sobre todo por esos besos que te costaban tanto darnos je je Gracias!!!!!!

Salo, Lupita, Laura, Aurora, Dulce, Balvi, Fátima

Gracias hermanas por que de cada una de ustedes yo siempre aprendo algo, Todas venimos del mismo cimiento que papá y mamá formaron y que a Dios gracias esto nos mantiene juntas a todas, y ser lo que somos una gran familia. Gracias hermanitas LAS AMO, todas son unas verdaderas guerreras y luchonas.

A cada una Dios nos ha puesto pruebas en cierta etapa de nuestras vidas pero siempre hemos salido adelante porque nos tenemos la una a la otra.

De manera muy especial quiero dedicar este trabajo a mi hermana

BALVINA

Muchas gracias hermanita, parte de todo este trabajo es tuyo, y aquí te entrego los frutos de lo que sembraste en mí, No te equivocaste y tu esfuerzo para conmigo valió la pena, Gracias por estar siempre presente, por esos regañones, esas alegrías, esas tristezas que compartimos juntas. Eres una gran mujer, que se arriesga para apoyarnos, yo estoy muy agradecida contigo, porque sé los sacrificios que has hecho, se que no lo dices pero jamás olvidaré que tu apoyo en mi vida fue mucho. Todos tus sacrificios los valoro, ya que en ti tuve el apoyo que en su momento necesite y bueno se que con esto no pago tu esfuerzo pero te doy el mérito que te mereces.

Gracias hermanita

A todos mis sobrinos

Rodrigo	Luis Enrique
Diana Joseline	Víctor Dámaso
Luis Ángel	Job Sebastián
María Isabel	José Antonio
Sergio Manuel	Atziri Lizbeth
Edgar Ulises	Diego Iván
César Iván	José Manuel
Ana Laura	José de Jesús
Verónica	Samuel
Ivon Guadalupe	Alondra
Mariana	

Todos ustedes son parte de mi vida, me han regalado momentos maravillosos, los he visto crecer uff y lo que me falta y gustaría decirles que NUNCA ES TARDE, siempre luchen por sus sueños, valórense, quiéranse, ámense y jamás dejen de aprender y de soñar, porque todo sueño se hace realidad, fórgense un destino y jamás se den por vencidos, para todo siempre existe una solución, los quiero mucho y pues salud!!!! Ja ja ja . es broma es broma....

A mis cuñados

Angel, Luis, José de Jesús, Sergio, Dámaso

Gracias por formar parte de esta familia y sobre todo gracias por apoyar y estar al pie del cañón cuando se necesita. Muchas gracias.

Agradezco a todas esas personitas que Dios ha puesto en mi camino y que uno elije vivir ciertas etapas de su vida a su lado, Gracias Arianna, Rubén, Pablo, Ivon, Rocío, Liliana, Chío. Por formar parte de mi vida.

Profesor Gerardo Cruz Jiménez

Gracias por apoyarme a terminar este trabajo, por el tiempo dedicado al mismo, por compartir su conocimiento y entendimiento. Muchas gracias.

A mis asesores

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Por el apoyo, tiempo y consejos para realizar mi trabajo

M. en C. Sofía González Gallardo

Por su paciencia, sus consejos, su apoyo, su interés y su tiempo para terminar este trabajo.

Igualmente quiero expresar mis agradecimientos a mis sinodales

M.F.C. María Eugenia Rosalía Posada Galarza

M. en C. Alberto Nathaniel Soto Guevara

Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio

M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel.

Quienes me ofrecieron valiosos comentarios al revisar gentilmente mi trabajo, en verdad les agradezco de todo corazón a todos y cada uno de ustedes por formar parte de mi formación profesional.



INDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	VI
Índice de fotos.....	VII
Lista de abreviaturas.....	IX
Resumen.....	X
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Limpieza	3
1.3. Esterilización	4
1.4. Desinfección	6
1.4.1. Tipos de desinfectantes según su actividad	6
1.4.2. Mecanismo de acción de los desinfectantes	9
1.4.3. Clasificación de los desinfectantes	10
1.4.4. Nuevas Tecnologías	13
1.4.5. Selección de un desinfectante	13
1.4.6. Características del desinfectante ideal	15
1.5. Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro	15
1.5.1 Estericide Qx	17
1.5.2. SoluVet	19
1.6. Que es una espora	20
1.6.1. Generalidades	20
1.6.2. Propiedades biológicas de las esporas	21
1.7. Generalidades de <i>Bacillus</i>	23



1.7.1. Hábitat	23
1.7.2. Fuente de energía y nutrición	23
1.7.3. Funciones	24
1.7.4. Importancia sanitaria y ambiental	24
1.7.5. Bacillus stearothermophilus	24
1.7.6. Requerimientos nutricionales	24
1.8. Clostridium spp.	25
1.8.1. Características generales	25
1.8.2. Hábitat	25
1.8.3. Funciones	25
1.8.4. Importancia Sanitaria y ambiental	26
1.9. Ensayo Colorimétrico de Mosmann.....	26
2. Objetivo General	27
2.1. Objetivos Particulares	27
3. Hipótesis	27
4. Justificación	28
5. Material y Equipo	29
5.1. Material	29
5.2. Equipo	29
5.3. Medios de cultivo	29
5.4. Reactivos	30
5.5. Material biológico	30
5.6. Producto químico	30
6. Diagrama General de Trabajo	31
7. Metodología	32
7.1. Aislamiento e identificación de las esporas	32
7.2. Procedimiento para obtención de esporas de clostridium spp.	32
7.3. Procedimiento para obtener esporas de la cepa de clostridium spp.	32
7.4. Procedimiento para obtención de esporas de Bacillus stearothermophilus	33
7.5. Ensayo 1 (esporas versus Estericide Qx. y SoluVet concentrado).....	35
7.6. Diagrama de flujo para Bacillus stearothermophilus	36
7.7. Diagrama de flujo para clostridium spp	37
7.8. Ensayo 2 (En microplaca, esporas con el producto a diferentes diluciones).....	38
7.9. Diagrama de la dilución en placa	40
7.10. Prueba de MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazolium)	42
7.11. Microscopía Electrónica	44
7.12. Diagrama de proceso de preparación de esporas para ser observadas en microscopio electrónico de Transmisión	46
7.13. Técnica de Tinción Negativa	47
8. Resultados	48
8.1. Aislamiento de Bacillus stearothermophilus en Agar BHI	48



8.1.2. Tinción de Gram	48
8.2. Aislamiento de <i>clostridium spp</i>	49
8.2.1. Tinción de Gram	49
8.3. Diferenciación de esporas	50
8.4. Pruebas Bioquímicas para la identificación del género de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	50
8.5. Pruebas Bioquímicas para la identificación del género <i>clostridium spp</i>	52
8.6. Resultados del primer ensayo (ensayar la espora con el producto (Estericide Qx. y SoluVet) a volúmenes altos) ambos productos concentrados	54
8.7. Resultados del segundo ensayo (ensayar la espora con los productos a diferentes concentraciones a volúmenes pequeños) En microplaca	56
8.7.1. Microplaca del ensayo para <i>Bacillus stearothermophilus</i>	57
8.7.2. Placas de Agar BHI representando los resultados de la microplaca para <i>Bacillus</i>	57
8.7.3. Microplaca del ensayo para <i>clostridium spp</i>	58
8.7.4. Placas de Agar BHI representando los resultados de la microplaca para <i>clostridium spp</i> ...	58
8.8. Observaciones obtenidas en Microscopio Electrónico	59
8.8.1. Microfotografías de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	59
8.8.2. Microfotografías de <i>clostridium spp</i>	60
9. Discusión de Resultados	62
10. Conclusiones	67
11. sugerencias	67
12. Referencias Bibliográficas	68



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producto Estericide Qx.	17
Figura 2. Producto SoluVet	19
Figura 3. Morfología de una espora	21
Figura 4. Endosporas de <i>Bacillus spp.</i>	23
Figura 5. Esquema de microplaca	28
Figura 6. Rotulación de cajas petrí	41
Figura 7,8, 9 ,10. Sembrado en placa de agar BHI de los productos estudiados a diferentes concentraciones	42
Figura 11, 12, 13,14. Ensayo con <i>clostridium</i> en condiciones de esterilidad	44
Figura 15 Técnica de tinción negativa	47
Figura 16 Pie diabético tratado con SES	65



INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 Niveles de acción de los desinfectantes	8
Tabla No. 2 Ejemplo de agentes activos y su mecanismo de acción	10
Tabla No. 3 Pruebas de identificación para bacterias esporuladas	34
Tabla No. 4 Preparación del ensayo de dilución en placa	39
Tabla No.5 Tabla representativa de cómo quedara la microplaca con las diluciones realizadas a los productos estudiados	43
Tabla No. 6 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar al género de Bacillus stearothermophilus	50
Tabla No. 7 Pruebas Bioquímicas realizadas para identificar al género de clostridium spp.	52
Tabla No. 8 Resultados del primer ensayo	55
Tabla No. 9 Resultados generales de la microplaca	56



INDICE DE FOTOS

Foto No. 1 y 2 Colonias de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	48
Foto No. 3 Tinción de Gram de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	48
Foto No. 4 y 5 Colonias de <i>clostridium spp.</i> Sembradas en agar BHI	49
Foto No. 6 Tinción de Gram para el género de <i>clostridium spp.</i>	49
Foto No. 7 Esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	50
Foto No. 8 Esporas de <i>Clostridium spp.</i>	50
Foto No. 9 y 10 Prueba de catalasa para <i>Bacillus stearothermophilus</i>	51
Foto No. 11 Prueba de SIM para <i>Bacillus</i>	51
Foto No. 12 Prueba de Nitratos para <i>Bacillus</i>	51
Foto No. 13 Prueba de dextrosa para <i>Bacillus</i>	51
Foto No. 14 Prueba de sacarosa para <i>Bacillus</i>	51
Foto No. 15 Crecimiento de <i>Bacillus stearothermophilus</i> en agar sangre	51
Foto No. 16 Prueba de Catalasa para <i>Clostridium spp.</i>	52
Foto No. 17 Pruebas de dextrosa y lactosa para <i>clostridium spp.</i>	53
Foto No. 18 Prueba de SIM para <i>clostridium spp.</i>	53
Foto No. 19 Prueba de sacarosa para <i>clostridium spp.</i>	53
Foto No. 20 Prueba de maltosa para <i>clostridium spp.</i>	53
Foto No. 21 Placa de Agar sangre sin sembrar	54
Foto No. 22 Crecimiento de <i>clostridium spp.</i> En Agar sangre	54
Foto No. 23 y 24 Crecimiento de <i>clostridium spp.</i> En agar yema de huevo	54
Foto No. 25 <i>Bacillus stearothermophilus</i> frente a SoluVet concentrado	55
Foto No. 26 <i>Bacillus stearothermophilus</i> frente a Estericide concentrado	55
Foto No. 27 <i>Clostridium spp.</i> Frente a SoluVet concentrado	55
Foto No. 28 <i>Clostridium spp.</i> Frente a Estericide concentrado	55
Foto NO. 29 Microplaca sin reactivo MTT y sin incubar	57
Foto No. 30 Microplaca con reactivo MTT después de la incubación	57
Foto No. 31 Placa de Agar BHI con Estericide para <i>Bacillus</i>	57
Foto No. 32 Placa de Agar BHI con SoluVet para <i>Bacillus</i>	57
Foto No. 33 Microplaca sin incubar para <i>clostridium spp.</i>	58
Foto No. 34 Microplaca después de la incubación para <i>clostridium spp.</i>	58
Foto No. 35 Placa de Agar BHI con SoluVet para <i>clostridium spp.</i>	58
Foto No. 36 Placa de Agar BHI con Estericide para <i>clostridium spp.</i>	58
Foto No. 37 Espora de <i>Bacillus stearothermophilus</i> con SSF	59
Foto No. 38 <i>Bacillus</i> versus Estericide	59
Foto No. 39 <i>Bacillus</i> versus SoluVet	60



Foto No. 40 Espora de <i>clostridium spp.</i> versus SSF.....	60
Foto No. 41 Espora de <i>clostridium spp.</i> versus SoluVet	61
Foto No. 42 Espora de <i>clostridium spp.</i> versus Estericide	61
Foto No. 43 Espora de <i>Bacillus subtilis</i> con SSF.....	64
Foto No. 44 Espora de <i>Bacillus subtilis</i> tratada con SES 60 ppm.	64
Foto No. 45 Desinfección SES en áreas críticas	66



LISTA DE ABREVIATURAS

UFC	unidades formadoras de colonias.
SES	Solución Electrolizada de Superoxidación con pH neutro.
SSF	Solución Salina Fisiológica.
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril.
BHI	Agar infusión cerebro- corazón.
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión.
MTT	3-(4,5-dimetil-2-ilo)-2,5- difeniltetrazolio
m.o.	Microorganismos.
mg.	Miligramos.
µg.	Microgramos.
µl.	Microlitros.
ppm.	Partes por millón.
rpm.	Revoluciones por minuto.
spp.	Especie no determinada.



RESUMEN

En todos los tiempos, los seres humanos hemos estado rodeados de una gran gama de microorganismos que nos causan daño, dentro de la industria farmacéutica, laboratorios o instituciones de salud, la palabra infección o contaminación constituyen un problema de magnitud mundial por su elevada frecuencia, consecuencias fatales y alto costo por tratamientos, existiendo en la actualidad actividades concretas para su prevención y control. Los métodos de lucha antimicrobiana (la desinfección y esterilización) intervienen como elementos de ruptura de la cadena de transmisión de la infección. La gran problemática existente en estos lugares frente al control de la contaminación microbiana y la selección más apropiada de antisépticos y desinfectantes nos lleva a implementar métodos no dañinos y eficientes para evaluar la efectividad de estos compuestos. Es muy amplia la capacidad de los microorganismos, de adaptarse a los agentes bacteriostáticos, y además que no todas las bacterias son susceptibles a ser atacadas por los desinfectantes por sus características morfológicas. El objetivo de este trabajo es Demostrar que los dos Desinfectantes–Esterilizantes con nombre comercial SoluVet y Estericide Qx., tienen efecto esporicida en diferentes cepas de bacterias capaces de producir esporas. Las bacterias utilizadas son ***Bacillus stearothermophilus*** y ***Clostridium spp.*** Se aislaron las dos bacterias, se identificaron, posteriormente se obtuvieron las esporas. Se realizaron dos ensayos, el primero fue esporas versus productos Estericide Qx. y SoluVet concentrados, el segundo con los productos a diferentes diluciones. Nos apoyamos en la técnica colorimétrica de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión. Obteniendo como resultado que los productos Estericide Qx y SoluVet eliminan a las esporas de ***Bacillus stearothermophilus*** pero “solo” concentrado y con respecto a *Clostridium spp.*, se observó que con el producto Estericide Qx. Concentrado no hay crecimiento y con SoluVet si lo hay, ya que al cultivar las esporas crecieron en el medio de cultivo. Y al ser observadas con el Microscopio Electrónico las dos esporas muestran que si ocasionan daño ambos productos.



1 INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

Desde años atrás y hasta la actualidad el ser humano se encuentra rodeado de microorganismos (m.o) los cuales le ocasionan daño, para enfrentar esta situación ha buscado la manera más adecuada para controlarlos y eliminarlos. Hasta que se supo que los microorganismos provocan las enfermedades, no se confiaba en la necesidad de esterilización, desinfección y medidas sanitarias. Resultó necesario crear instrumentos para observar a los microorganismos; los m.o. tuvieron que desarrollarse y estudiarse en cultivos puros en el laboratorio; y hubo que investigar el efecto de muchas sustancias y condiciones sobre ellos.

Hace miles de años los egipcios y hebreos utilizaban algunos aceites aromáticos para conservar materiales que podían descomponerse y seguían algunas leyes sanitarias que hoy podemos comprender gracias a nuestras informaciones relativamente recientes en el campo de la microbiología. Aristóteles le recomendó a Alejandro el grande que en sus ejércitos hirvieran el agua de bebida y enterraran la excreta y las deposiciones de los animales de carga. Los viejos romanos edificaron acueductos para llevar agua pura a la ciudad. ¿Cuánta sabiduría práctica en un mundo totalmente desconocedor de los microorganismos? (1)

Pasteur alrededor de 1863 demostró que las infecciones son causadas por microorganismos; Koch descubrió (cerca de 1865) muchas causas microbianas de enfermedad y mejoró los criterios para aclarar la causa del trastorno; Lister fue el primero en utilizar ácido carbólico diluido (fenol) (alrededor de 1867) con el fin de evitar y tratar infecciones en cirugía. Semmelweis (cerca de 1848) insistía en que los doctores se lavaran las manos antes de ayudar a un parto; y Oliver Wendell Holmes (cerca de 1843) también insistían en que se lavaran las manos en la práctica obstétrica. Con estos varones empezó la práctica moderna de la asepsia, la antisepsia y la desinfección. Los primeros intentos de desinfección recurrían principalmente a sustancias aromáticas y productos químicos que son desodorantes. Incluso actualmente el olor de los antisépticos se asocia (a veces erróneamente) con la limpieza.

Uno de los primeros empleos sistemáticos y dirigidos del calor para destruir microorganismos de los alimentos (aunque los microorganismos todavía no se conocían) fue en respuesta a una demanda hecha por Napoleón Bonaparte que solicitaba mejores alimentos para sus ejércitos. Un científico francés Nicolás Appert, alrededor de 1805, creó un proceso para conservar alimentos envasados, mediante el calor. El proceso se llamó "appertización"; incluía calor, vapor y presión; esencialmente, era el proceso de la autoclave, un método de esterilización utilizado actualmente en la industria de conservas, en las clínicas de sanidad pública y en todos los hospitales.

Otra causa del empleo de calor para destruir microorganismos fue señalada por Pasteur. En 1863 comprobó que la cerveza y el vino que se echaban a perder podían conservarse sometiéndolos a temperaturas de 50 a 60°C durante unos cuantos minutos. En 1898 esta técnica fue adoptada en Dinamarca para desinfectar la leche. El proceso pasó a conocerse más tarde como pasteurización.



Koch utilizó un método de calor intermitente a 100°C para esterilizar los medios de cultivo. Tyndall, científico británico, perfeccionó el método de esterilización fraccionada con el fin de destruir bacterias formadoras de esporas y desde entonces se llama tindalización, Alrededor de 1880 Charles Chamberland, un colaborador de confianza de Pasteur construyó un aparato similar a la moderna olla de presión, que era la autoclave primitiva.

En la profesión sanitaria hay que tener presente que los microorganismos existen constantemente a menos que se hayan tomado precauciones especiales para matarlos o suprimirlos. También es necesario percatarse de que, si bien la mayor parte de microorganismos de nuestro ambiente son inofensivos y millones de ellos penetran en nuestro cuerpo cada día, llevan mezcladas frecuentemente especies patógenas, en muchas circunstancias es esencial destruir o eliminar estos microorganismos patógenos, para ello se han creado diversas técnicas modernas de cirugía, sanidad pública, hospital y laboratorio.

Como ocurre con muchas técnicas, los resultados obtenidos dependen sobre todo de la inteligencia y la destreza de la persona que hace el trabajo y solo secundariamente del aparato. En los hospitales se dispone de equipo complicado y caro pero esto no es obstáculo alguno para lograr unas buenas prácticas de esterilización y desinfección. Para luchar con éxito contra una enfermedad hay que tener constantemente presente la vida del mundo invisible. (1)

Durante este tiempo las personas dedicadas al estudio de los microorganismos nos dieron las herramientas para poder conocer y por consiguiente enfrentar y así mismo solucionar los grandes problemas que estos ocasionan hasta nuestros tiempos como por ejemplo Leeuwenhoek hace doscientos cincuenta años se asomó por primera vez a un mundo nuevo y misterioso poblado de millares de seres pequeñísimos de diferentes especies algunos feroces y mortíferos, otros útiles y hasta indispensables para muchos ramos de la industria que enriquece al hombre.(2)

Pasteur en el siglo pasado encuentra que la causa de numerosas enfermedades contagiosas son los microorganismos que se transmiten utilizando diferentes mecanismos. (2)

Koch demostró que los microbios se podían multiplicar y gracias a esto se pudieron aislar cepas puras. Y emprendió nuevas investigaciones para descubrir al microorganismo que produce la tuberculosis. Y así existen muchos más nombres importantes que contribuyeron en el descubrimiento y los estudios de los m.o. (2)

El término de desinfección así como el de esterilización es de suma importancia para la microbiología y el control de estos m.o.

Las técnicas para esterilizar materiales (es decir; para liberarlos de organismos viables contaminantes) fueron primero desarrolladas como un requisito previo para la preparación de cultivos puros en el laboratorio. Después se adaptaron rápidamente, en medicina, cirugía y sanidad pública, para prevenir la difusión de la enfermedad infecciosa. (6)

Finalmente, la cal clorada (hipoclorito cálcico) y el ácido fenico (fenol) fueron introducidos a principios del siglo XIX como desodorantes de aguas residuales y desperdicios (y a continuación de heridas) incluso antes de ser reconocida su acción germicida.



En 1867 el cirujano británico Josep Lister utilizo por primera vez el fenol como desinfectante para vendajes e instrumentos quirúrgicos, asocio el descubrimiento de las bacterias y su participación en la génesis de la infecciones, por lo que introdujo el concepto de asepsia en la práctica quirúrgica y la idea de prevenir la infección mediante los antisépticos , utilizando las nebulizaciones con fenol para desinfectar el aire, el lavado de manos del cirujano y la desinfección de la zona quirúrgica.(7)

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

A través de los trabajos de Von Bergmann se crearon las técnicas de esterilización por vapor posteriormente con los descubrimientos de nuevos antisépticos, ha ido mejorando la lucha contra la infección. Todas estas habilidades se han modificado a lo largo de los últimos años. (8)

Por otro lado, la antisepsia constituye los pilares de la prevención de una contaminación e infección a nivel hospitalario e industrial. (8)

1.2 LIMPIEZA

La limpieza se define como el proceso de remover a través de medios mecánicos y/o físicos, el polvo, la grasa y otros contaminantes de las superficies, equipos, materiales, personal, etc. Este proceso, junto con un adecuado proceso de desinfección, es indispensable para controlar la presencia de los microorganismos en el ambiente.

Para realizar una limpieza adecuada se deben considerar el tipo de acción del agente utilizado (remoción mecánica, disolución o detergente) las condiciones requeridas para aplicar la solución limpiadora y el tiempo de contacto necesario para que este ejerza su efecto.

Las soluciones limpiadoras generalmente contienen agentes alcalinos o ácidos con o sin detergentes , por ejemplo agentes tensoactivos no iónicos , Estas deben ser compatibles con la superficie que va a ser limpiada , tener buena capacidad de humectación y emulsificación y ser capaz de remover lo sucio, sin dejar ningún tipo de residuo.

Para cada área se debe establecer la frecuencia de limpieza requerida de acuerdo al volumen de trabajo, personal, material que se utiliza. También se debe establecer el momento más apropiado para realizarlo y seguir un procedimiento cuya eficacia haya sido determinada previamente. (29)

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

La frase **“no hay desinfección sin limpieza previa”** es clásica de los manuales de desinfección y esterilización. La limpieza previa es una condición para que los procesos de desinfección o esterilización sean efectivos. Con el proceso de limpieza es posible



reducir la carga bacteriana del instrumental o zona a tratar en 10^4 unidades formadoras de colonia (UFC), La limpieza puede realizarse de forma manual o automatizada. (9)

Una limpieza efectiva depende de:

- Elección adecuada del producto de limpieza
- Temperatura del agua
- Dureza del agua
- pH del agua utilizada
- Periodo de contacto
- Método de aplicación del detergente (por espuma, a través del equipo o tubería "Cleaning In Place" CIP o Limpieza In Situ, aspersion, etc.)

Conociendo todo lo anterior es importante mencionar que las bacterias han sido un tema importante tanto para hospitales como para la industria farmacéutica estas ocasionan problemas en su forma vegetativa pero existe otra forma que no todas las bacterias poseen y esta es la espora.

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

1.3 ESTERILIZACION

Mantener controlados los procedimientos para la eliminación de microorganismos como prácticas sanitarias en el laboratorio es de gran importancia, ya que algunos microbios son capaces de destruir materiales valiosos como madera y fibras textiles causando pérdidas que necesitan evitarse con medidas eficaces. Aun existen más razones para controlar los microorganismos, tales como:

- -prevenir la contaminación o proliferación de microorganismos
- -prevenir el deterioro o destrucción de materiales por los microorganismos
- -controlar la purificación del agua y la pasteurización de la leche
- -conservación y preservación de los alimentos
- -mantener el material y equipo de laboratorio estéril para su utilización.

Por estos motivos los microorganismos se eliminan por medio de agentes y procedimientos físicos, hoy en día se cuentan con una gran variedad de técnicas y agentes que actúan de manera diferente cada uno, pero en general tiene como finalidad liberar cualquier superficie, objeto y medio de remoción ó muerte de todos los microorganismos que los contaminen ya sea en estado vegetativo o esporulado, este proceso recibe el nombre ESTERILIZACION.

Para llevar a cabo un proceso de esterilización hay que considerar lo siguiente:



1.- Tipo de material a esterilizar

- vidrio
 - plástico
 - ropa
 - materia orgánica
- soluciones farmacéuticas
 - leche
 - alimentos
 - agua
 - medios de cultivo

2.- Tipo de microorganismo.

Las especies de microorganismos difieren en su susceptibilidad a los agentes químicos o físicos esterilizantes. Por ejemplo, las esporas son la forma orgánica más resistente, son capaces de sobrevivir en condiciones físicas o químicas muy adversas.

3.- Estado fisiológico

Las células jóvenes por tener intenso metabolismo, son menos vulnerables que las células viejas, de menos actividad metabólica así como cambios en la membrana celular, ya que el envejecimiento afecta la permeabilidad de esta.

4.-Ambiente en que se encuentra el microorganismo.

Las propiedades físicas y químicas del medio o de la sustancia que contiene el medio en que vive el microorganismo, tienen gran influencia en la velocidad y eficiencia de la destrucción microbiana. La presencia de materia orgánica extraña reduce notablemente la eficiencia de la esterilización.

5.-Sitios de acción o agente esterilizante.

El daño a algunas estructuras celulares inicia las alteraciones que llevan a la célula a la muerte.

I.- la viabilidad de una célula está vinculada con el mantenimiento de las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos en su estado natural.

II.-una célula viva normal contiene múltiples enzimas indispensables para su desarrollo metabólico

III.-la membrana semipermeable citoplasmática mantiene la integridad del contenido celular, la membrana citoplasmática regula selectivamente el paso de sustancias entre la célula y el medio exterior e incluso en el sitio donde reaccionan algunas enzimas.

IV.- la pared celular proporciona a la célula una cubierta protectora, además de participar en determinadas etapas fisiológicas. (3)

Con base en los agentes y procesos físicos se clasifican las diferentes etapas de esterilización.

Los requisitos de esterilización para hospitales, laboratorios e industria farmacéutica se traslapan en muchas formas. El tratamiento de bultos de hospital, instrumentos, aparatos de laboratorio, medios de cultivo y soluciones farmacéuticas requieren ciclos de esterilización y equipo que es común a cada rama del hospital. Los fabricantes de esterilizadores están por lo tanto diseñando equipo que se adapte fácilmente a sus necesidades. (3)



1.4 DESINFECCION

Dentro del control de la contaminación microbiológica existe un método de destrucción y eliminación de microorganismos mediante el uso de agentes físicos y químicos, llamado DESINFECCION el cual se clasifica de acuerdo a la capacidad que posee un agente para destruir o eliminar un microorganismo en un área animada ó inanimada así como de la manera que se lleve a cabo este.

Un agente desinfectante tiene como objetivo disminuir lo más posible la cantidad de microorganismos presentes en algún lugar determinado. (3)

Un desinfectante es un microbicida que inactiva casi todos los microorganismos patógenos reconocidos de los objetos inertes, PERO no necesariamente todas sus formas, por ejemplo: esporas bacterianas.

Es importante llevar a cabo la desinfección ya que con esto se puede prevenir y controlar la diseminación de un microorganismo. También se pueden evitar pérdidas económicas en la industria así como la contaminación en áreas clínicas de hospitales que traen como consecuencias en ocasiones que se agraven más los pacientes que ahí se encuentran y también se encuentra afectado el personal que labora en dicho lugar.

Considerando la importancia de la desinfección, tanto en el área industrial como en la clínica, existen lineamientos ya establecidos los cuales describen la sanitización de edificios, disposición de desechos, limpieza, mantenimiento de equipo, es decir el control de la contaminación microbiológica.

Algunos procesos de este control se llevan a cabo tomando en cuenta la aplicación de acciones preventivas, entre las cuales destaca el uso adecuado de agentes antimicrobianos para la eliminación de microorganismos.

De acuerdo a su aplicación de dichos agentes se clasifican en:

Sanitizante: es la sustancia capaz de matar en 30 segundos al 99.99% de las bacterias.

Desinfectante: agente empleado para la destrucción de microorganismos patógenos de superficies inanimadas.

Antiséptico: agente que es empleado para destruir patógenos sobre tejidos vivos.

Esterilizante: agente capaz de eliminar o destruir todo microorganismo presente. (3)

1.4.1. TIPOS DE DESINFECTANTES SEGÚN SU ACTIVIDAD

Las sustancias con actividad biocida tienen grados variables de actividad sobre los diferentes grupos de microorganismos, se pueden clasificar en tres categorías según su potencia y efectividad contra los microorganismos. Desinfección de Alto, intermedio y bajo nivel.



DESINFECCION DE ALTO NIVEL (DAN)

Se caracteriza por actuar inclusive sobre las esporas bacterianas (forma más resistentes dentro de los microorganismos), produciendo una esterilización química si el tiempo de acción es el adecuado (15 min).

Se utilizan sobre instrumentos médicos o quirúrgicos termosensibles. Son rápidamente efectivos sobre bacterias no esporuladas. Por lo general el número de esporas en el material a desinfectar es insignificante, por lo que la esterilización es rápida (15 min). Dentro de este grupo se encuentran

- I. Oxido de Etileno.
- II. Formaldehído al 8% en alcohol al 70%.
- III. Glutaraldehído al 2%.
- IV. Peróxido de Hidrógeno.

Todos estos son desinfectantes estrictos, no pudiéndose usar como antisépticos.

DESINFECCION DE NIVEL INTERMEDIO (DNI)

Desarrollo por el cual se eliminan formas vegetativas de bacterias, incluyendo M. tuberculosis, hongos y virus, pero no necesariamente las esporas bacterianas. Suelen denominarse tuberculicidas.

Algunos agentes son:

- I. Compuestos clorados (por ej.: hipoclorito de sodio).
- II. Compuestos iodados (iodóforos y alcohol iodado).
- III. Compuestos fenólicos.
- IV. Alcoholes.
- V. Clorhexidina.

La mayoría de estos son utilizados como desinfectantes y antisépticos.

DESINFECCION DE BAJO NIVEL (DBN)

Es por este medio del cual se elimina la mayoría de las bacterias, algunos virus y algunos hongos, pero no necesariamente microorganismos resistentes como el bacilo de la tuberculosis o esporas bacterianas:

- I. Compuestos de Amonio cuaternario:
- II. Compuestos mercuriales

En la práctica estos compuestos se utilizan para la limpieza doméstica mientras que están prácticamente en desuso en los hospitales y laboratorios debido al empleo de tácticas más agresivas para la desinfección.



Tabla No. 1 Niveles de acción de los desinfectantes.

NIVEL DE ACCION DESINFECTANTE	EFICACIA CONTRA					
	BACTERIAS			HONGOS	VIRUS LIPOFILICOS Y MEDIOS	VIRUS NO LIPOFILICOS Y PEQUEÑOS
VEGETATIVAS	BACILO TUBERCULOSIS	ESPORAS				
ALTO	+ a	+	+	+	+	+
INTERMEDIO	+	+	+d	+	+	+/- c
BAJO	+b	-	-	+/-	-	c

(a) Incluye esporas asexuales pero no necesariamente sexuales

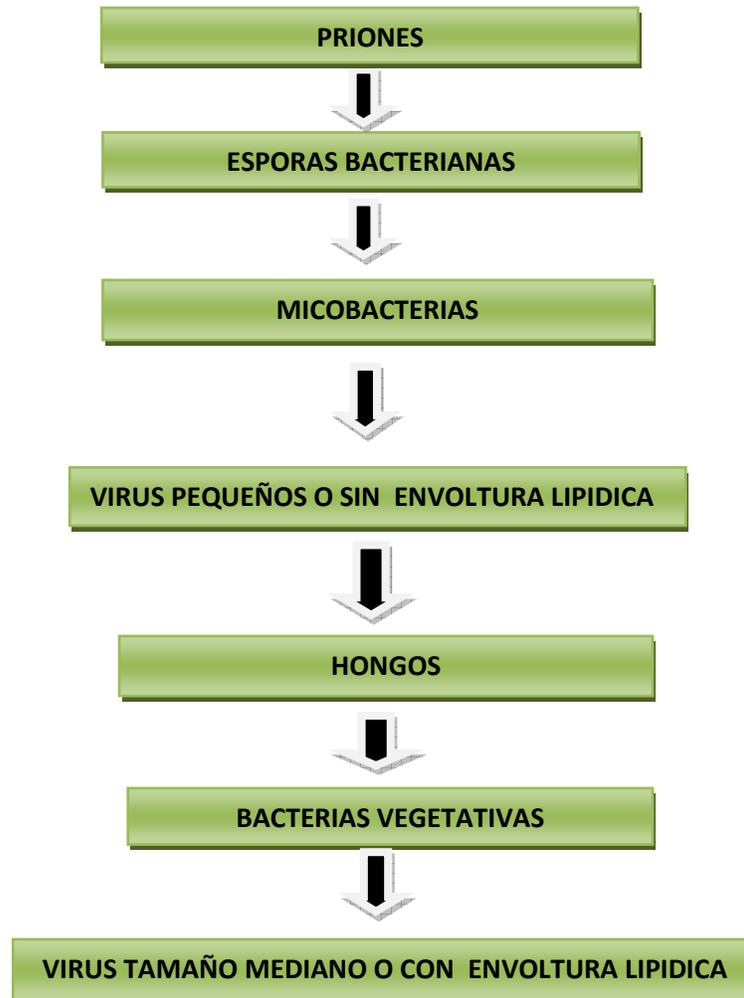
(b) Formas comunes de células bacterianas. Efecto letal, que puede esperarse cuando se emplean correctamente las concentraciones de uso normal de desinfectantes químicos o la pasteurización; poco o ningún efecto letal

(c) Los desinfectantes de alto nivel tienen la capacidad de esterilización real solo con tiempos prolongados de exposición

(d) algunos microbicidas de nivel intermedio, por ejemplo yodóforos, tintura de yodo y compuestos clorados, pueden esperarse que presenten alguna acción esporicida

(e) algunos microbicidas de nivel intermedio, por ejemplo, alcoholes y compuestos fenólicos pueden tener actividad virucida limitada.

Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencia al ataque de estos agentes químicos, es recomendable el ciclado o rolar a estos mismos. Actualmente se conoce el orden decreciente de resistencia de los microorganismos a los desinfectantes como a continuación se describe: (3)



1.4.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS DESINFECTANTES

Los desinfectantes intervienen en algunas etapas de la vida microbiana, Los mecanismos de acción son complejos, la acción puede ejercerse principalmente sobre una función comprometiéndose luego otra, algunas veces reversible y otras irreversibles. Dentro de los principales mecanismos de acción de los desinfectantes se encuentran: (50)

- Daño de la pared celular, llevando a los microorganismos a la lisis.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, impidiendo el transporte selectivo de nutrientes al interior de la célula bacteriana.



- Alteración de la naturaleza coloidal del citoplasma, desnaturalizándola o coagulándola.
- Inhibición de la acción enzimática.
- Formación de antimetabolitos.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

TABLA No. 2 ejemplo de agentes activos y su mecanismo de acción.

ACCIÓN	GRUPO QUÍMICO
PARED CELULAR Y MEMBRANA CELULAR	<ul style="list-style-type: none"> • ALDEHÍDOS • TENSOACTIVOS ANIÓNICOS • FENOLES Y DERIVADOS • BIGUANIDAS
MATERIAL CELULAR	<ul style="list-style-type: none"> • OXIDO DE ETILENO • COLORANTES • AGENTES ALQUILANTES
ENZIMAS O PROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • AGENTES OXIDANTES • HALÓGENOS • ALCOHOLES • ÁCIDOS Y ÁLCALIS • METALES PESADOS

1.4.3. CLASIFICACIÓN DE LOS DESINFECTANTES (49)

FÍSICOS

IRRADIACIÓN ULTRAVIOLETA:

Radiación UV a longitudes de onda de 240 a 480 nm. BAJO NIVEL.

PASTEURIZACIÓN (CALOR HÚMEDO): 75 - 100°C. BAJO NIVEL.

QUÍMICOS:

GLUTARALDEHÍDO (2%):

- Interfiere con la actividad enzimática, con la síntesis y función de los ácidos nucleicos y densifica el citoplasma.



- Los vapores pueden ser irritantes de los ojos y membranas mucosas.
- Produce dermatitis por contacto
- Su actividad depende del PH
- Desinfectante de alto nivel para instrumental, equipos de anestesia y endoscopios. No se utiliza para fines de limpieza.

FORMALDEHÍDO (37% ACUOSO; 8% IPA):

- Densifica el protoplasma por coagulación de proteínas (desnaturaliza).
- Reacciona con los grupos amino de las proteínas. Reacciona con RNA.
- Los vapores pueden ser irritantes para membranas mucosas. Por contacto puede producir dermatitis. Desinfectante de alto nivel.
- Se utiliza para desinfección de instrumental, puede ser corrosivo. En áreas, fue utilizado por vaporización. Se usa para fijar piezas anatomopatológicas.

ORTO-FTALDEHIDO (0.55%):

- Mecanismo de acción no establecido en forma clara.
- Máximo 14 días de rehusó, (hacer control con tirilla). Descartar después de 14 días. Vida útil de anaquel: 1 año (en recipiente hermético) pero si se destapa solo dura 75 días (aun sin usar).
- Actividad depende de la temperatura. Mancha la piel, pisos y textiles por contacto.
- No debe desecharse por la cañería, inactivarse con glicina previamente.
- Desinfectante de alto nivel

COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO:

- Incrementa la permeabilidad de la membrana celular, la debilita y ataca el sistema enzimático. Produce extravasación del protoplasma.
- desinfectantes de nivel medio (cetrimida) o bajo (cloruro de benzalconio).
- desinfección de instrumental no crítico, algunas veces superficies no críticas.

GLUTARALDEHÍDO (0.06%) FORMALDEHIDO (0.013%) CETRIMIDA (0.051%).

- Asocia el mecanismo facilitador de cetrimida sobre la membrana celular permitiendo la rápida penetración de los aldehídos.
- Desinfección de áreas, superficies, muebles, equipos, instrumental.
- Aplicación por aspersion, contacto o inmersión.

DERIVADOS CLORADOS: HIPOCLORITO DE SODIO Y DICLOROISOCIANURATO DE SODIO.

- El cloro libre / ácido hipocloroso inhibe las reacciones enzimáticas, desnaturaliza proteínas e inactiva ácidos nucleicos.



- Vapores irritantes, dermatitis por contacto.
- Desinfección de nivel medio.
- Altamente corrosivo, inestable, debe prepararse a diario.
- Se emplean para verduras, pisos, ropa quirúrgica contaminada. No para equipos ni instrumental.

ALCOHOLES: ETANOL O ISOPROPANOL (70 - 95%)

- La destrucción microbiana ocurre por coagulación de proteínas celulares.
- Desinfección de nivel medio. Volátil, sólo ejerce su acción mientras se encuentra en solución.
- Uso para instrumentos delicados, no debe usarse en lentes ópticas (disuelve el cemento); por exposición larga puede engrosar y endurecer materiales de plástico.

COMPUESTOS FENÓLICOS:

- Producen coagulación de proteínas (desnaturalización) de las bacterias .Pueden ocasionar rápida lisis celular, expulsión del contenido celular sin lisis o desnaturalización enzimática.
- Acción tóxica por penetración a través de la piel.
- Uso: desinfección de superficies, de elección para excrementos (cresoles), nivel medio o bajo
- Son corrosivos para los metales y numerosos materiales.
- No son biodegradables.

COMPUESTOS YODADOS

- El mecanismo de acción sobre los microorganismos se ejerce por un proceso de oxidación de enzimas esenciales, además de reaccionar con el nitrógeno amínico, oxidar los grupos sulfhídrico y saturar los dobles enlaces de los residuos tirosínicos de proteínas.
- Altamente corrosivos, por su poder oxidante.

PEROXIDO DE HIDRÓGENO

- Ataca la membrana celular lipofílica y el ADN con los radicales libres de hidroxilo producidos.
- Bactericida, contra M. tuberculosis a alta concentración (6-10%), fungicida.
- Corrosivos debido a su poder oxidante.



ÁCIDO PERACÉTICO (0.001 – 0.2%)

- Actúa por destrucción de radicales sulfhídrido y enlaces disulfuro de las proteínas. La destrucción de dobles enlaces deteriora la función quimio-osmótica de la membrana celular.
- Bactericida a bajas concentraciones, fungicida (*Aspergillus spp.*), virucida y esporicida de rápida acción.
- Desinfectante de equipos de terapia respiratoria, equipos de hemodiálisis, endoscopios y dispositivos médicos.
- Corrosivo para Metales.

1.4.4. NUEVAS TECNOLOGÍAS

AGUA SUPEROXIDADA (electrólisis de agua y sal).

La Solución Electrolizada de Superoxidación con pH Neutro al constituirse de ácido hipocloroso (HClO), actúa en diferentes sitios de la estructura bacteriana (pared y membrana celular, sistemas para la elaboración de enlaces de alta energía y finalmente en los ácidos nucleicos), así puede alterar la pared, la membrana, los ácidos nucleídos y enzimas (desnaturalizando y/o precipitando) o la combinación de ellas. El peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas y en particular los aminoácidos son los sitios donde actúa primariamente la SES, al lisarse la bacteria, los otros mecanismos pasarían a ser secundarios, pero no menos importantes. En virus su blanco son las proteínas capsídicas o de la envoltura, originando la pérdida de la especificidad en ambos casos. (43)(11).

1.4.5. SELECCIÓN DE UN DESINFECTANTE

En el proceso de selección de desinfectantes el primer criterio por considerar es el campo de aplicación y el nivel de desinfección que se pretende lograr. En ese proceso deberán incluirse los siguientes aspectos:

Definición de las características del desinfectante.

Criterios de evaluación del producto.

Bases de evaluación de las características.

Definición de características del desinfectante.

Este aspecto establece una base para relacionar las características de calidad y actividad del producto. Las características por analizar son:

1. **Ingrediente activo-concentración.** Característica que permite conocer el nombre genérico del producto –principio activo– y su contenido en el producto. De esta forma se



establece una comparación entre valores reportados por la casa comercial y la evidencia científica en relación con la acción antimicrobiana del producto y otras características como su acción residual.

2. **Actividad antimicrobiana.** Es la capacidad que tiene el producto para eliminar microorganismos. En este ítem deben considerarse los niveles de desinfección esperados alto, intermedio, bajo y el área de aplicación del mismo.

3. **Descripción del producto.** Permite evaluar las características físicas: color, olor, aspecto, solubilidad, homogeneidad, presentación, cantidad de producto por unidad de envase y sus indicaciones de uso.

4. **Valoración por autoridad competente.** Documentación avalada por la autoridad reguladora competente.

5. **Estabilidad.** Tiempo de vigencia durante el cual el producto permanece activo. Los cambios que sufra la sustancia en almacenamiento deben ser mínimos, con el fin de que no pierda su acción.

6. **Biodegradabilidad.** Es la inocuidad del producto frente al medio ambiente. Se define como el porcentaje de degradación del producto en la unidad de tiempo.

7. **Compatibilidad con las superficies.** Se relaciona con los efectos adversos que pueda tener el producto sobre los materiales en los que se aplica o que entran en contacto con el mismo.

8. **Datos de seguridad.** Relacionados con los factores de riesgo que se generan durante el manejo del producto, tales como: Identificación de la sustancia activa o del preparado.

Composición o información sobre los componentes.

Identificación de peligros.

Primeros auxilios.

Medidas de lucha contra incendios.

Medidas a tomar en caso de vertimiento accidental.

Manipulación y almacenamiento.

Controles de exposición y protección personal.

Propiedades físicas y químicas.

Estabilidad y reactividad.

Información toxicológica: toxicidad aguda, sub-aguda, crónica.

Información ecológica: Biodegradabilidad, efectos ecotóxicos y biológicos.

Forma de eliminación.

Forma de transporte.

Información reglamentaria: etiquetado, pictograma.

Identificación de la sociedad o empresa que lo produzca o lo distribuya.

Otras informaciones.



9. **Tiempo de acción.** Tiempo de exposición requerido para que el producto cumpla con el objetivo.

10. **Forma de aplicación.** Recomendaciones acerca del modo de empleo.

11. **Campo de aplicación.** Responde a las preguntas dónde y para qué se requiere emplear el producto.

12. **Aspectos económicos.** Relación costo-beneficio. El costo debe evaluarse en relación con la dilución, el rendimiento y la seguridad.

13. **Valor agregado.** Otros beneficios ofrecidos por el producto o por el proveedor –efecto residual, suministro de elementos adicionales, equipos para su uso, capacitación, entrenamiento, beneficios adicionales por adquisición mediante distribuidores o fabricantes–.

1.4.6. CARACTERISTICAS DEL DESINFECTANTE IDEAL

Se considera desinfectante ideal aquel agente químico o físico que nos asegura una completa destrucción de los microorganismos que nos proponemos a eliminar, afectando lo menos posible el material con el que estamos tratando, los seres vivos y los equipos que estarán en contacto con esta, el ambiente y que se obtenga un costo razonable. Entre otras consideraciones se pueden detallar las siguientes.

1. Toxicidad: Poseer un espectro de actividad amplio y a bajas concentraciones.
2. Solubilidad: Debe ser soluble en agua.
3. Inocuidad: No debe ser tóxico para las personas
4. Estabilidad: No debe perder su actividad a la concentración y dilución recomendada por el fabricante.
5. Homogeneidad: La preparación debe tener composición uniforme.
6. Activo a temperatura ambiente.
7. Poca afinidad por la materia orgánica. Algunos desinfectantes tiene afinidad por la materia orgánica, de manera que al combinarse con ella reduce su efectividad para actuar contra los microorganismos.
8. No debe ser corrosivo ni manchar.
9. Capacidad de penetración .Si no penetra puede quedar reducida su actividad sólo en la superficie sobre la que se aplica.
10. Desodorante y detergente.
11. Económico y de fácil adquisición.(buena relación coste/ beneficio).

1.5. SOLUCION ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACION CON PH NEUTRO



Para desinfectar áreas y materiales de trabajo, en los laboratorios de diagnóstico e investigación, así como en hospitales de salud pública, generalmente se emplean soluciones desinfectantes como detergentes y cloro a diferentes concentraciones. Existen en el mercado otros productos desinfectantes que ayudan a eliminar el crecimiento de microorganismos; recientemente se ha empleado con este fin las Soluciones Electrolizadas de Superoxidación con pH Neutro (SES).

Las SES son relativamente de reciente tecnología. Descritas en 1996 por Tanaka, desde su aparición comercial han llamado mucho la atención por su efectividad en contra de bacterias, virus, hongos, esporas y micobacterias, así como por su baja toxicidad en tejidos y fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho.(50)

Existen muchos sinónimos de soluciones de Superoxidación, como aguas electrolizadas, ácidos fuertes electrolizados en solución acuosa, soluciones oxidantes mixtas y solución electrolítica ácida. Sin embargo, todos estos nombres sirven para definir a las (SES).

Este producto se prepara con agua purificada más una solución saturada de cloruro de sodio. El agua purificada se somete a un proceso de electrólisis, en el cual, el agua pasa a través de una serie de membranas que generan y controlan iones de forma estable. Al final de este proceso se obtiene una solución electrolizada, con pH neutro y cantidades controladas de iones en forma estable. (11)

- Mecanismo de acción: Se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhídrico (SH-) y aminoácidos de la pared bacteriana, generando lisis bacteriana y afectando el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios, inhibición en la síntesis de proteínas, alteración en la energía (adenosin fosfato), rompimiento de las cadenas de RNA y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular.
- Espectro. Su espectro microbicida es amplio con capacidad micobactericida, viricida y bactericida en menos de 5 minutos y esporicida en 15 minutos.
- Ventajas: incolora, inolora, no es tóxica para las células del organismo humano.
- Indicaciones: Estas soluciones se han convertido en una posible alternativa en el área de desinfección. Algunos de los usos en investigación incluyen: tratamiento de enfermedad periodontal y desordenes de la piel, irrigación interna y fístulas, fascitis y peritonitis y la cura de heridas crónicas. Desinfección de áreas hospitalarias (quirófanos, terapia intensiva, cuneros etc.) o instrumental quirúrgico.

1.5.1 ESTERICIDE QX

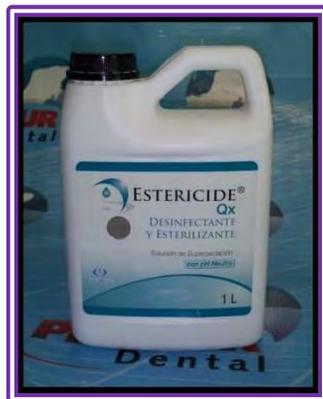


Figura No. 1 Producto Estericide Qx.

Descripción: ESTERICIDE® QX es una solución de Superoxidación por selectividad iónica de pH neutro con actividad desinfectante. No tóxico, se aplica sin diluir es 100% eficaz contra bacterias, virus, hongos y esporas; obtenido por un proceso de electrólisis de alta tecnología, dando como resultado una solución de Superoxidación con pH neutro siendo un producto activo controlado y estable. ESTERICIDE® QX es una solución de Superoxidación desinfectante de alto nivel y esterilizante de amplio espectro útil para desinfección de áreas hospitalarias e instrumental de curación, quirúrgico y equipo médico especializado.

Forma farmacéutica y formulación: ESTERICIDE® QX: cada 100 ml contiene: elementos activos controlados 8.5 - 9.5 mg. Vehículo cbp 100 ml. El rango de pH es de 6.4 a 7.5.

Indicaciones: *Desinfección de áreas hospitalarias:* quirófanos (p.ej. pisos, techos, paredes), salas de urgencias, cuneros, terapias intensivas e intermedias, unidades de diálisis y hemodiálisis, áreas de quemados, etc. instrumental de curación y quirúrgico. Equipos de endoscopía, laparoscopía, inhaloterapia, sondas, equipo de terapia intensiva, catéteres, instrumental quirúrgico, etc.

Modo de empleo: *Desinfección de áreas hospitalarias:* ESTERICIDE® QX se utiliza directamente, sin ningún tipo de dilución ni activación. En todo caso, y antes de su aplicación, deberá eliminarse por completo toda la materia orgánica contaminante en las superficies inertes (p.ej. sangre, heces, etc.). El lavado apropiado con agua y con jabón será suficiente para lograr este objetivo. Asimismo, es indispensable que cualquier superficie en la que se vaya aplicar ESTERICIDE® QX se encuentre completamente seca



para evitar la dilución del producto y, con ello, la posible disminución en su actividad antimicrobiana.

ESTERICIDE® QX debe aplicarse preferentemente con un aspersor o nebulizadora que produzca micro gotas. Se recomienda que en cada procedimiento se realicen dos aspersiones en un lapso de 5 minutos y que, posteriormente, el área quede cerrada por espacio de 15 minutos.

En todo caso habrá que evitar mojar las conexiones y circuitos eléctricos del equipo que esté en el quirófano. Después de este tiempo, solo se tendrá que secar el exceso de ESTERICIDE® QX en paredes, pisos y techos con una compresa estéril. La frecuencia con la que se debe realizar un exhaustivo de quirófano dependerá del tipo de cirugías y del número de ellas que se llevan a cabo en el día. Esta decisión queda completamente al juicio y experiencia de cada institución.

Desinfección de instrumental quirúrgico y endoscopios: el primer paso en la desinfección de este material deberá ser el lavado exhaustivo con agua y jabón para saponificar las grasas y erradicar por completo cualquier materia orgánica (p.ej. sangre, heces, etc.). Posteriormente, el material deberá ser sumergido en su totalidad en la solución por selectividad iónica ESTERICIDE® QX por 15 minutos. Al cabo de este tiempo el material podrá ser utilizado de inmediato sin necesidad de enjuagarse, aún sin necesidad de secarse. Esto es posible gracias a la ausencia de toxicidad de ESTERICIDE® QX a piel y mucosas. Si se pretende reutilizar ESTERICIDE® QX para la desinfección del material, esta conducta será responsabilidad exclusiva del usuario, quien deberá validar en cada caso la efectividad desinfectante del producto.

Reacciones secundarias: No se han reportado a la fecha. Estudio de Biodegradabilidad: esta prueba la realizó el centro de estudios del medio ambiente (CEMA), mediante el método de azul de metileno dando como resultado que ESTERICIDE® QX es un producto totalmente biodegradable. *Estudio de estabilidad:* se efectuaron estudios de estabilidad a largo plazo para determinar su conservación a temperatura ambiente y su período de caducidad a 18 meses.

Precauciones: La administración oral de ESTERICIDE® QX no está indicada en ninguna condición. Sin embargo, si hubiera ingesta accidental de hasta 200 ml de ESTERICIDE® QX no habrá reacciones secundarias ni requerirá de tratamiento de quelación o lavado gástrico. No obstante, se ha documentado que la ingesta de un litro en un corto periodo de tiempo indujo diarrea que se auto limitó en las primeras 24 horas. En personas idiosincrásicas en las que haya irritación cutánea por uso crónico y frecuente de ESTERICIDE® QX, la suspensión de su uso será suficiente para revertir la reacción dérmica. Se recomienda seguir cuidadosamente las instrucciones del fabricante. La inoculación ocular accidental de ESTERICIDE® QX no suele producir ardor ni enrojecimiento del ojo. Aun en casos en los que la inoculación haya sido abundante no será necesario realizar un lavado ocular a menos de que la persona sea muy sensible y reporte dolor o ardor. Por

todas estas razones, y aun conociendo la inocuidad del producto, se recomienda mantenerlo fuera del alcance de los niños. Protéjase de la luz solar.

Recomendaciones sobre almacenamiento: Consérvese a temperatura ambiente. *Características generales:* no tóxico. Solución de Superoxidación con pH neutro, desinfectante de alto nivel y esterilizante, 100% eficaz contra bacterias virus, hongos y esporas. ESTERICIDE® QX de uso externo. Aplicación directa.

Presentación (es): ESTERICIDE® QX se presenta en envase de polipropileno blanco opaco de 1, 1.8, 3, 4 y 5 litros. (51)

1.5.2. SOLUVET



Figura No. 2 Producto SoluVet

Solución desinfectante de alto nivel para uso en programas de bioseguridad. Fórmula: Solución electrolizada de Superoxidación con pH neutro a 0.006% de Cl activo.

Uso en: instalaciones, equipo y material de uso veterinario.

Descripción: SoluVet® es un desinfectante de alto nivel con la capacidad de eliminar en 30 segundos bacterias, virus y hongos, y en 15 minutos esporas presentes en las superficies de cualquier instalación. Es inocuo, por lo cual no presenta efectos secundarios y puede utilizarse en presencia de animales.

Indicaciones: SoluVet® está indicado en programas de bioseguridad debido a que puede ser utilizado desde los procesos de sanitización hasta los de esterilización en frío del instrumental quirúrgico o de cualquier equipo que lo requiera, sin temor a dañarlo por corrosión, al impedir la diseminación de microorganismos patógenos y no patógenos, lo cual evita la propagación de enfermedades clínicas y subclínicas que afecten la salud, el bienestar y la producción de los animales.

Características:



- Inocuo.
- No tóxico.
- Es inodoro, insípido e incoloro.
- Tiene grado alimenticio.
- Biodegradable.
- No emite vapores.
- Es activo desde -5°C hasta 100°C .
- Su pH es neutro.
- No se requiere equipo especial de seguridad para su manejo y/o aplicación.
- Es seguro para el operario y los animales, puesto que no irrita la piel ni las mucosas.
- No es corrosivo.
- No deja residuos.
- Activo en superficies porosas y lisas.

Modo de uso: *Para sanitización y desinfección:* Realizar con anticipación un lavado exhaustivo con agua y jabón y enjuagar. Se recomienda utilizar Soluvel® en una dilución hasta 1% (1:100). Sumergir o aplicar mediante turbina, termonebulizador, aspersor o nebulizador. El tiempo de acción del producto dependerá del grado de desinfección deseado y será proporcional al grado de contaminación presente, se sugiere de 30 segundos a 10 minutos (entre más contaminación se presente, dejar actuar mayor tiempo Soluvel®). No requiere enjuague.

Para desinfección de alto nivel (esterilización en frío): Se recomienda eliminar todo residuo orgánico, después lavar el instrumental o equipo con agua y jabón, y enjuagar a la perfección. Para esterilizar por inmersión, colocar el equipo o material en un recipiente de plástico y verter el producto Soluvel® sin diluir hasta cubrirlo. En el caso de requerir equipo o material de gran tamaño se sugiere esparcir o dejar fluir Soluvel® sin diluir. Para lograr una desinfección de alto nivel el producto deberá dejarse actuar por 15 minutos. El material ya esterilizado no requiere enjuagarse y se podrá usar de inmediato utilizando técnica estéril.

Vía de administración: Soluvel® por su nula toxicidad no representa riesgo alguno por aspiración o contacto en los animales ni seres humanos. Queda a criterio del médico veterinario incrementar o disminuir las diluciones sugeridas y el método de aplicación.

1.6 QUE ES UNA ESPORA

1.6.1 Generalidades

En condiciones de stress como por ejemplo mal de suministro de C, N o P, ciertos bacilos Gram positivos (*Bacillus aerobios* y *Clostridium anaerobios*) y algunas sarcinas y actinomicetos producen formas altamente resistentes y deshidratadas denominadas endosporas o esporas (en griego, semilla) las endosporas bacterianas carecen de actividad metabólica, no obstante, las esporas bacterianas están especialmente adaptadas para una supervivencia prolongada en condiciones adversas, ya que son especialmente resistentes frente a los efectos letales del calor, la desecación, la congelación, los productos químicos tóxicos las radiaciones.

Las esporas son medicamente importantes en la diseminación de algunas enfermedades y en la preparación de materiales estériles, han despertado a si mismo amplio interés como modelo unicelular simple para la diferenciación celular. Aunque la resistencia al calor ha recibido mayor atención, el principal papel ecológico de las esporas es probablemente la supervivencia en estado de sequedad (o en un medio no nutritivo), son células muy refractivas y extraordinariamente deshidratadas, no se tiñen con los colorantes comunes (Gram, azul de metileno).

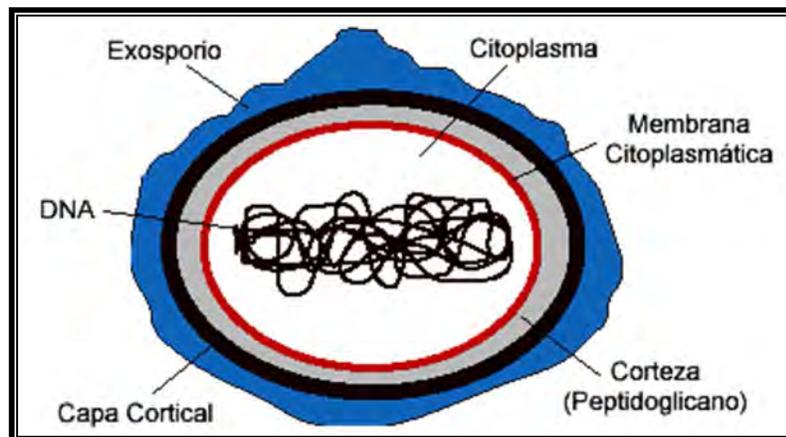


Figura No. 3 Morfología de una espora



1.6.2 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS ESPORAS

Las esporas bacterianas comienzan a formarse durante la fase estacionaria de crecimiento cuando se han agotado uno o más nutrientes del medio, pueden sobrevivir en ambientes adversos durante meses o años (100), y una vez que las condiciones de crecimiento sean apropiadas pueden germinar y desarrollarse para formar células vegetativas. Las endosporas se caracterizan por un bajo contenido de agua, no tienen un metabolismo detectable, y carecen de compuestos de alta energía como ATP y otros nucleósidos trifosfatos. Además, son altamente resistentes a la desecación, congelación, radiación y a la acción de ciertas sustancias químicas.

Normalmente, el DNA de una célula procarionte sufre lesiones espontáneas debido a la **depurinización, desaminación, alquilación y oxidación** de los nucleótidos o al efecto de la radiación UV. Sin embargo, en las células vegetativas estos daños son rápidamente reparados por efectivos sistemas enzimáticos. En cambio, las esporas bacterianas no presentan actividad enzimática pero han desarrollado distintas estrategias que evitan la acumulación de daños potencialmente letales en su DNA durante el estado de latencia. Estas son:

El bajo contenido de agua retarda o altera las reacciones químicas que afectan al DNA. Este menor contenido de agua disminuye la tasa de depurinización y la fotoquímica del DNA frente al UV respecto a las de una célula vegetativa. La radiación UV no genera dímeros de timina en el DNA de una spora sino un producto denominado SP (spore photoproduct) que es un compuesto similar a una timidil-timina.

El DNA de la spora se encuentra unido a unas proteínas denominadas alfa/beta-SASP (small acid-soluble proteins) que disminuyen el daño térmico del DNA evitando la depurinización y cambian la reactividad fotoquímica del DNA frente al UV formando los SP. Estas proteínas se hallan altamente conservadas en los géneros ***Bacillus* y *Clostridium***, y son sintetizadas durante la esporulación y degradadas durante la germinación.

El DNA alterado durante la latencia es reparado en los primeros momentos de la germinación.

Las esporas presentan una elevada concentración de **ácido dipicolínico** que permite complejar grandes cantidades de calcio iónico (Ca^{2+}). El ácido dipicolínico es una sustancia característica de la spora pero no se encuentra en la célula vegetativa.

Se pueden mencionar también de la siguiente manera:

- 1) **Hipometabolía:** Poseen la más baja tasa respiratoria de todos los seres vivos. Por ello son capaces de sobrevivir en ausencia de nutrientes durante largos períodos de tiempo.
- 2) **Dormancia:** Esta propiedad se refiere al hecho de que la spora tiene una gran inercia a los sustratos exógenos. Como veremos, la spora sólo perderá la dormancia cuando se haya activado para la germinación.

- 3) **Resistencia al calor:** Las esporas de ciertas especies resisten el calor húmedo de 120°C durante 10 min, lo cual condiciona los parámetros para esterilizar materiales. Esta elevada resistencia a las altas temperaturas es un subproducto de los cambios evolutivos que condujeron a la deshidratación como medio para lograr la hipometabolía y la dormancia. Por lo tanto, la deshidratación es la clave de las anteriores propiedades. (En cambio al menos parte de la resistencia al calor seco, es decir, en ausencia de vapor de agua, se debe a las proteínas SASP, que protegen al ADN de los daños oxidativos de este tipo de calor).z<A
- 4) **Deshidratación:** El muy bajo contenido en agua de la spora (0.3 g de agua/g de peso seco frente a los 3-4 g de agua/g de peso seco de la célula vegetativa) hace que la spora sea muy refráctil al microscopio óptico en fresco. Ello condiciona las propiedades 1, 2 y 3. (53)

1.7 GENERALIADES DE *BACILLUS* spp.

El género de *Bacillus* es una colección diversa de bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram positivos, formadores de esporas. El género incluye bacterias hemofílicas, sicrófilicas, acidofílicas, alcalofílicas y bacterias halofílicas que utilizan un amplio rango de suministro de carbono para crecimiento heterotrófico o autotrófico.

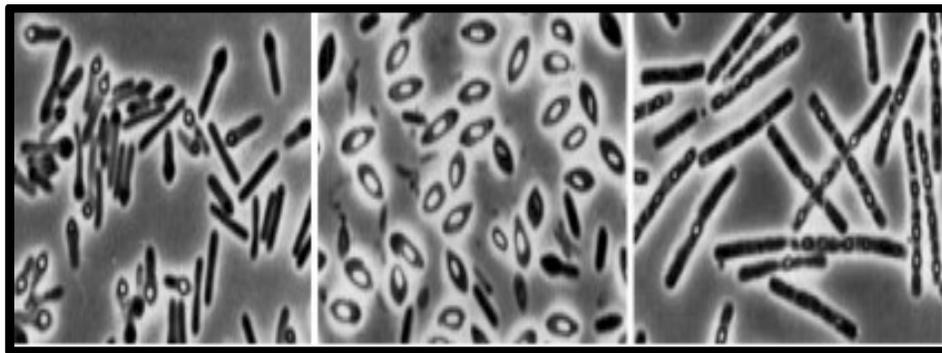


Figura No. 4 Endosporas de *Bacillus* spp.

- Bacilos rectos, aislados o en cadenas.
- bajo ciertas condiciones pueden formar cápsulas.
- Pueden aislarse fácilmente del suelo o de partículas de polvo en suspensión.
- Aerobias y aerobias facultativas.
- Existen especies psicrófilas y termófilas.



1.7.1 HABITAT

- Su hábitat principal es el suelo, aunque se encuentran ampliamente difundidos también en las aguas, sedimentos marinos, alimentos, productos farmacéuticos, etc.

1.7.2 FUENTE DE ENERGIA Y NUTRICION

- Medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como únicas fuente de carbono.
- Amoniaco como única fuente de nitrógeno.
- Producen una enzima hidrolítica que degrada polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite a estos usar dichos productos como fuente de carbono y donadores de electrones.

1.7.3. FUNCIONES

- Muchos producen antibióticos como la garamicidina, tiroxidina entre otros.
- Algunos elaboran enzimas hidrofílicas que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos.
- Varias especies son patógenas de insectos como: ***B. thuringiensis*** y ***B. popilliae***.

1.7.4. IMPORTANCIA SANITARIA Y AMBIENTAL

Son organismos saprofitos del suelo. Gracias a su capacidad para degradar carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos pueden emplearse en tratamientos de aguas que posean estos compuestos.

Los patógenos de insectos se pueden utilizar como insecticidas y controladores biológicos.

Aquellos que descomponen lípidos y polisacáridos podrían emplearse en tratamientos para desechos cargados en grasas (trampa grasas).

1.7.5. *Bacillus stearothermophilus* (28)

Es considerado un microorganismo ideal para monitorear los procesos de esterilización, porque carece de patogenicidad, pirogenicidad toxicidad y además es resistente a altas temperaturas.



De acuerdo a la farmacopea de los estados unidos mexicanos (FEUM), se establece que los indicadores biológicos deben cumplir con las características morfológicas, de cultivo y bioquímica de las cepas de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 para los ciclos de esterilización mediante presión a vapor.

1.7.6. Requerimientos nutricionales

Es un microorganismo termófilo que se desarrolla a 65°C, se ha encontrado en la naturaleza en lugares en donde existen formaciones de agua y yacimientos petroleros como en Rusia, Kazakhsatan China. Se puede desarrollar en medios sintéticos y no requiere factores de crecimiento, vitaminas, NaCl ó KCL.

1.8. Clostridium spp.

1.8.1. Características generales

- Son bacilos rectos o ligeramente curvados, aislados, en parejas o en cadenas.
- Móviles por flagelos peritricos o inmóviles.
- Producen endosporas ovoides o esféricas que deforman el bacilo.
- Anaerobios estrictos.
- Temperatura óptima de crecimiento entre 15° y 69° C.
- Amplia variedad de mecanismos de producción energética anaerobia.

1.8.2. HABITAT

- Se encuentran en el suelo, donde viven en bolsas anóxicas, que se han convertido en tales sobre todo por la acción de diferentes organismos al metabolizar diferentes compuestos orgánicos presentes en el suelo.
- También se encuentran en el intestino del hombre, animales, polvo, leche y aguas.

1.8.3. FUNCIONES

- Gran diversidad fermentativa: carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos.
- Algunas especies fijan el nitrógeno en forma anaerobia en el suelo (***C. pasteurianum***)



- Principales organismos que descomponen la celulosa en forma anaerobia en el suelo.
- Algunos producen toxinas generando enfermedad en el hombre y en animales.

1.8.4. IMPORTANCIA SANITARIA Y AMBIENTAL

- Pueden provocar enfermedades en las personas por la producción de toxinas: botulismo, tétanos.
- Los *Clostridium* causantes de enfermedades son un problema ecológico sin resolver ya que su hábitat impide un control directo sobre este.
- Fermentadores de azúcares pueden utilizarse como tecnología limpia en producción de acetona y alcoholes.
- Los que descomponen celulosa en forma anaerobia pueden utilizarse en el tratamiento de desechos en la industria del papel.
- Existe un interés industrial en la producción de etanol mediante la fermentación de celulosa por *Clostridium*.

1.9. Ensayo colorimétrico de Mosmann

Mosmann en 1983 desarrolla este método, siendo modificado por Francois Denizot y Rita Lang. El MTT conocido como Azul de Tiazol, es una sal de tetrazolio soluble en agua. En solución tiene una coloración amarilla, esta prueba ha sido previamente descrita para medir citotoxicidad y proliferación celular así como para un índice de medición de activación celular ambos cuantitativa y cualitativamente. Se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazodio (de color amarillo) en un producto de color azul (MTT formazan). La intensidad de color azul será proporcional al número de células vivas presentes. La absorbancia de colorante se mide a una longitud de onda de 540nm. O a la longitud más cercana. (61)



2. OBJETIVO GENERAL

Demostrar dos desinfectantes, esterilizantes de nombre comercial SoluVet y Estericide Qx, tienen efecto esporicida en dos bacterias que tienen la capacidad de formar esporas.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar el efecto esporicida de SoluVet® y Estericide Qx. concentrado y a diferentes diluciones, en *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium spp.*
- Evidenciar el efecto esporicida por medio de la técnica de Mosmann.
- Evidenciar el efecto esporicida por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión.

3. HIPOTESIS

Si Estericide Qx y SoluVet son desinfectantes y esterilizantes, podrán actuar como esporicidas bacterianos y entonces se podrá contar con una alternativa más, para evitar contaminaciones en áreas críticas de trabajo en la industria farmacéutica y hospitalaria.



4. JUSTIFICACION

Las esporas bacterianas resisten cambios bruscos de humedad y temperatura en el medio ambiente por períodos largos de tiempo, permaneciendo en un estado latente, esperando las condiciones adecuadas para germinar y así dar lugar a las formas vegetativas con actividad metabólica.

Los productos químicos tradicionales activos que causan daño a las esporas son extremadamente tóxicos, y ahí la importancia de estos nuevos desinfectantes y esterilizantes químicos para el control de esporas en centros hospitalarios, industria farmacéutica y alimenticia, laboratorios de diagnóstico e investigación entre otros.

Son muchas las pérdidas económicas por la contaminación con bacterias esporuladas en los lugares antes mencionados. El control de estas bacterias está bien establecido: aire estéril a partir de filtros HEPA, control del personal que ingresa a dichas áreas, vestimenta adecuada y estricta, monitoreo microbiológico de superficies y aire y finalmente el uso de germicidas, muchos de los cuales son nocivos para la salud del personal que los manipula y de los equipos con los cuales se ponen en contacto, por tal razón se propone el uso de Soluciones Electrolizadas de Superoxidación con pH Neutro (SES) las cuales son efectivas vs las esporas y/o las bacterias vegetativas, sin causar daño a los equipos y personal.



5. MATERIAL Y EQUIPO:

Material:

- Cajas petri estériles desechable de 90x15mm. (BD)
- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13x100mm. (PYREX)
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml (PYREX)
- Gradillas para tubos
- Micropipeta ajustable (BIOHIT)
- Puntas amarillas para micro pipeta sin marca (S/M)
- Asa bacteriológica (S/M)
- Frascos lecheros con tapa de baquelita (PYREX)
- Portaobjetos (S/M)
- Cubreobjetos (S/M)
- Matraz Erlenmeyer de 500ml (PYREX)
- Matraz Erlenmeyer de 250ml (PYREX)
- Matraz Erlenmeyer de 100ml (PYREX)
- Probeta graduada de 500ml (PYREX)
- Palillos estériles (S/M)
- Mechero de bunsen (S/M)
- Micro placa estéril (FALCON)
- Jarra GasPak (BBL)
- Sobres generadores de anaerobiosis GasPak (BD)
- Tiras indicadoras de anaerobiosis (BD)

EQUIPO

- Autoclave de vapor vertical (S/M)
- Refrigerador (ACROSS)
- Estufa Bacteriologica (RIOSSA)
- Microscopio óptico (OLYMPUS)
- Balanza granataria (OHAUS)
- Campana de flujo laminar (ARGOS)
- Microscopio Electrónico de Transmisión (JEM 100X JEOL)

MEDIOS DE CULTIVO

- Medio BHI agar (DIBICO)
- Medio anaeróbico agar (BIOXON)
- Caldo peptonada (agua peptonada)(DIBICO)
- Medio cooked meat (BIOXON)
- Agar gelatina nutritiva (BIOXON)
- Agar dextrosa(BIOXON)



- Base de agar urea de Christensen (DIBICO)
- Medio de nitratos (DIBICO)
- Medio de SIM (MERCK)
- Agar yema de huevo (DIBICO)
- Agar sangre (DIBICO)
- Leche tornasolada (BIOXON)

REACTIVOS:

- Aceite de inmersión (HYCEL)
- Agua destilada
- Tren de tinción de Gram
- Peróxido de hidrogeno al 30% (ALYT)
- MTT (3-(4,dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (SIGMA M-2128)
- Cloruro de sodio (PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY)

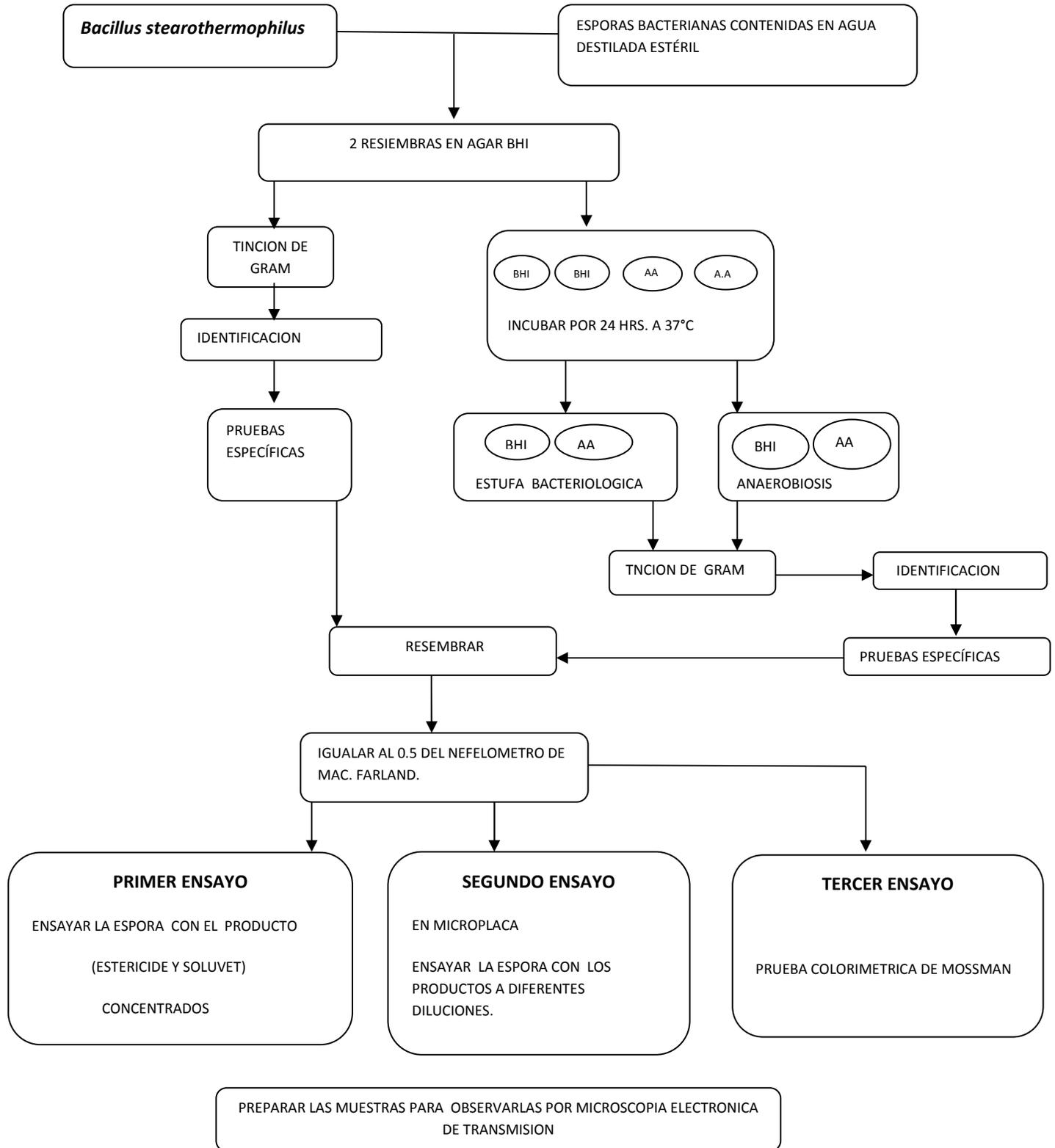
MATERIAL BIOLÓGICO

- *Bacillus stearothermophilus.*
- *Clostridium spp.*

PRODUCTO QUÍMICO

- Estericide Qx (Esteripharma)
- SoluVet (Esteripharma)

6. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



7. METODOLOGIA

Para comenzar a trabajar se prepararon medios de cultivo, se esterilizó el material y se elaboraron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

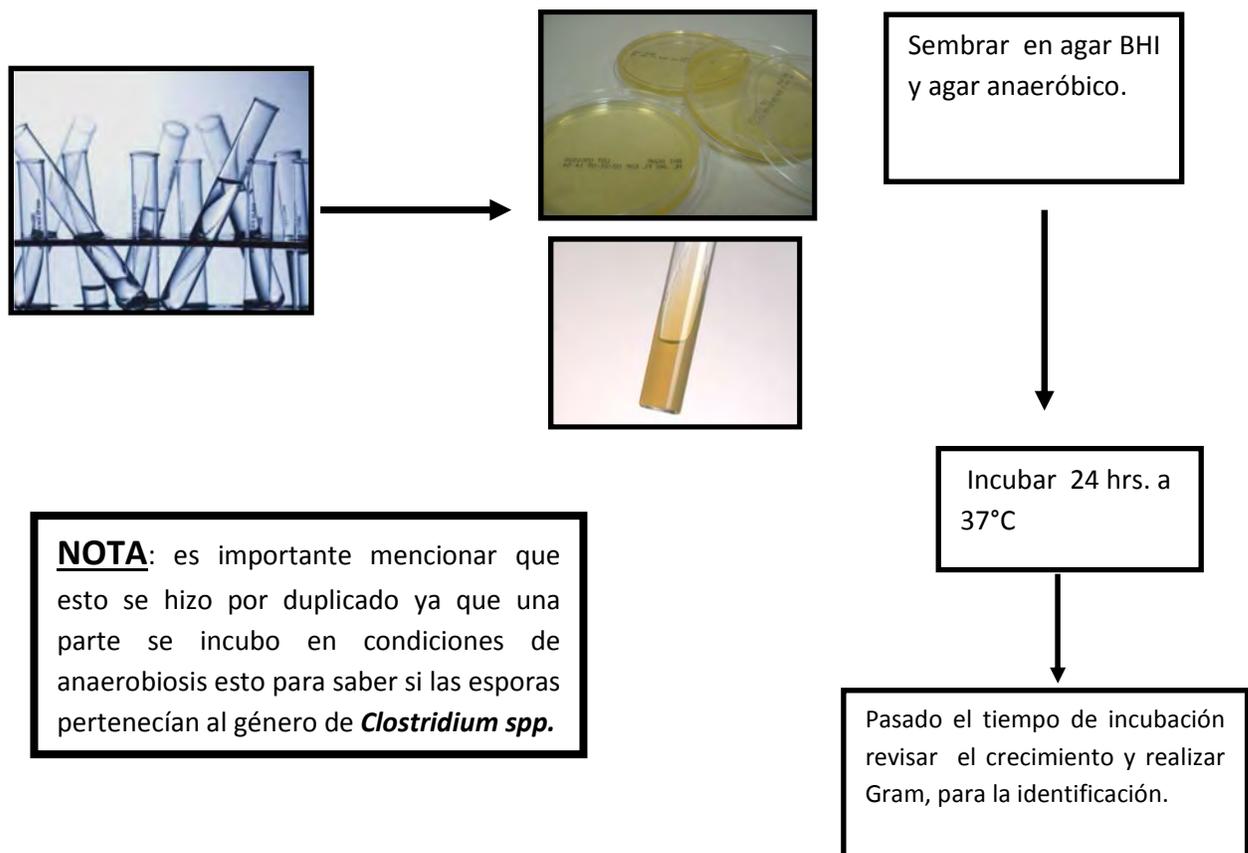
7.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS ESPORAS

Para realizar este trabajo se utilizaron dos tipos de bacterias que son capaces de producir esporas.

- *Bacillus stearothermophilus* (ampolleta)
- *Clostridium spp.* (tubos).

7.2. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LA CEPA DE CLOSTRIDIUM.

Es importante mencionar que la cepa de *Clostridium spp.*, fue donada por el laboratorio de investigación Microbiológica (Lab. 10) de la Unidad de Posgrado, se encontraban en tubos con agua destilada, de ahí se tomaron asadas para sembrarlas en agar BHI y agar anaeróbico e incubados en jarra GasPak (anaeróticamente).



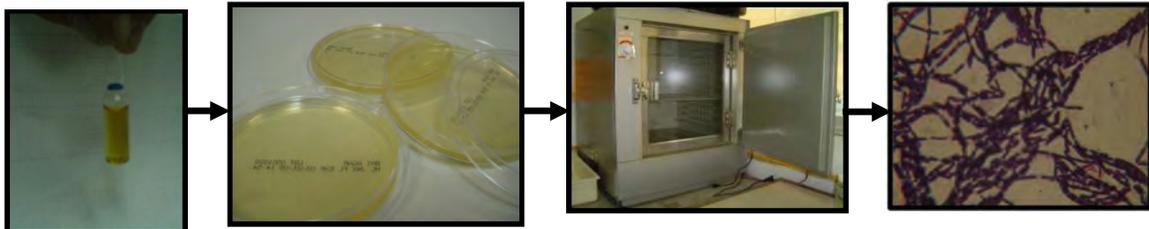
7.3. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER ESPORAS DE LA CEPA DE *Clostridium spp.*

Teniendo los cultivos jóvenes, se sometieron a esporulación, tomando varias asadas de las resiembras de los tubos y se colocaron en 4ml de agua destilada estéril en tubos con tapón de rosca dejándolos a temperatura ambiente por 72hrs.

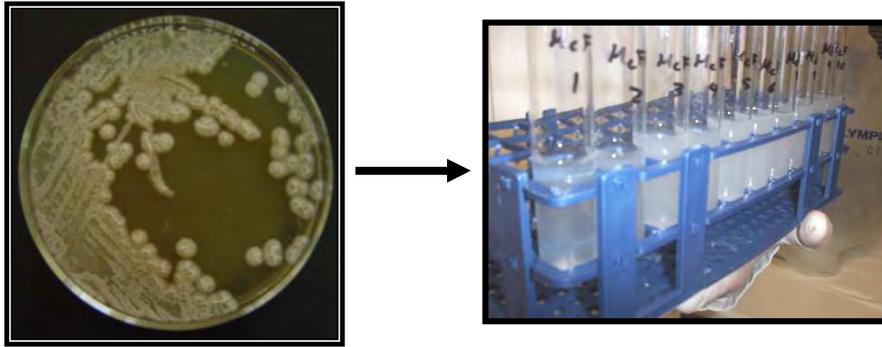
Pasado este tiempo se realizó Gram y al observar que aun había formas vegetativas se prosiguió a estresarlas sometiéndolas a cambios bruscos de temperatura, es decir se sometieron a refrigeración por 3 hrs. Concluido el tiempo se realizó Tinción Gram al seguir observando formas vegetativas, se metieron a la estufa bacteriológica por una hora a 37°C, se volvió a realizar Gram y al no tener éxito se volvió a dejar a temperatura ambiente por 24 hrs. todo esto con la finalidad de que las formas vegetativas esporularan y así obtener las esporas para llevar a cabo los ensayos.

7.4. PROCEDIMIENTO PARA OBTENCION DE ESPORAS DE *Bacillus Stearothermophilus.*

Se tiene una ampolleta con *Bacillus stearothermophilus*, el contenido de la misma se pasan a un tubo de ensaye con tapón rosca y se siembra en Agar BHI se incuba por 24hrs. a 37°C, pasado el tiempo de incubación se realiza Tinción de Gram.



Antes de realizar las pruebas, se hicieron 2 resiembras de cada uno de los microorganismos y a partir de estos cultivos se sometieron a esporulación las bacterias tomando varias asadas de las resiembras de los tubos que contenían a *Clostridium spp.* y de la resiembra de *Bacillus stearothermophilus*, se agregan en 4ml de agua destilada estéril por separado en tubos con tapón de rosca dejándolos a temperatura ambiente por 72hrs.



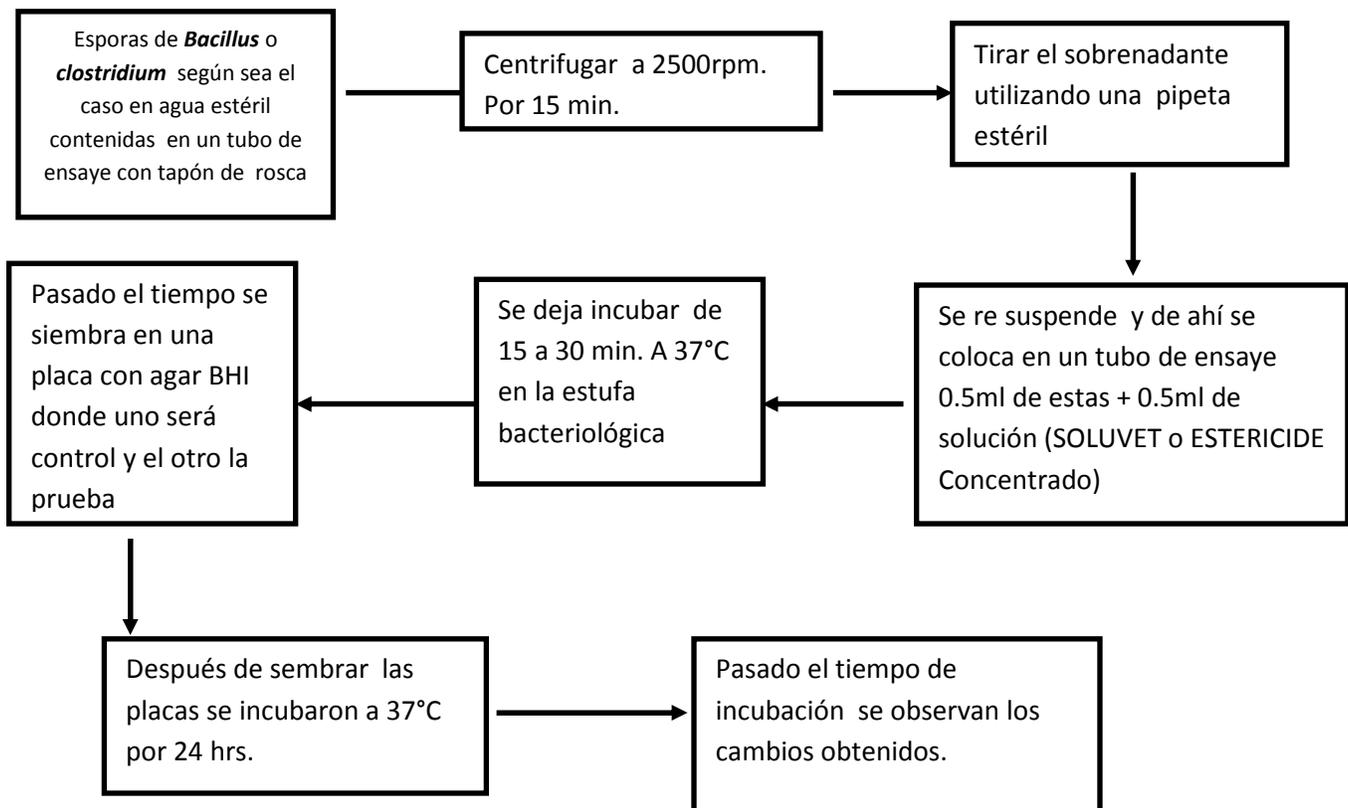
Pasado el tiempo de la incubación se realizaron pruebas de Gram como ayuda de la identificación así como las pruebas específicas para cada cepa bacteriana. Como se muestra en la tabla No. 3 Esto para corroborar que se va a trabajar con las bacterias esporuladas de interés.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION PARA BACTERIAS ESPORULADAS	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Clostridium spp.</i>
Tinción de Gram.	Tinción de Gram
SIM (motilidad)	SIM (motilidad)
Nitratos	acido de dextrosa
Gelatina	acido de lactosa
acido de dextrosa	acido de sacarosa
acido de manitol	acido de maltosa
acido de sacarosa	Catalasa
acido de galactosa	Gelatina
acido de lactosa	crecimiento en agar sangre
Catalasa	Agar yema de huevo

Tabla No. 3 Pruebas de identificación para bacterias esporuladas.

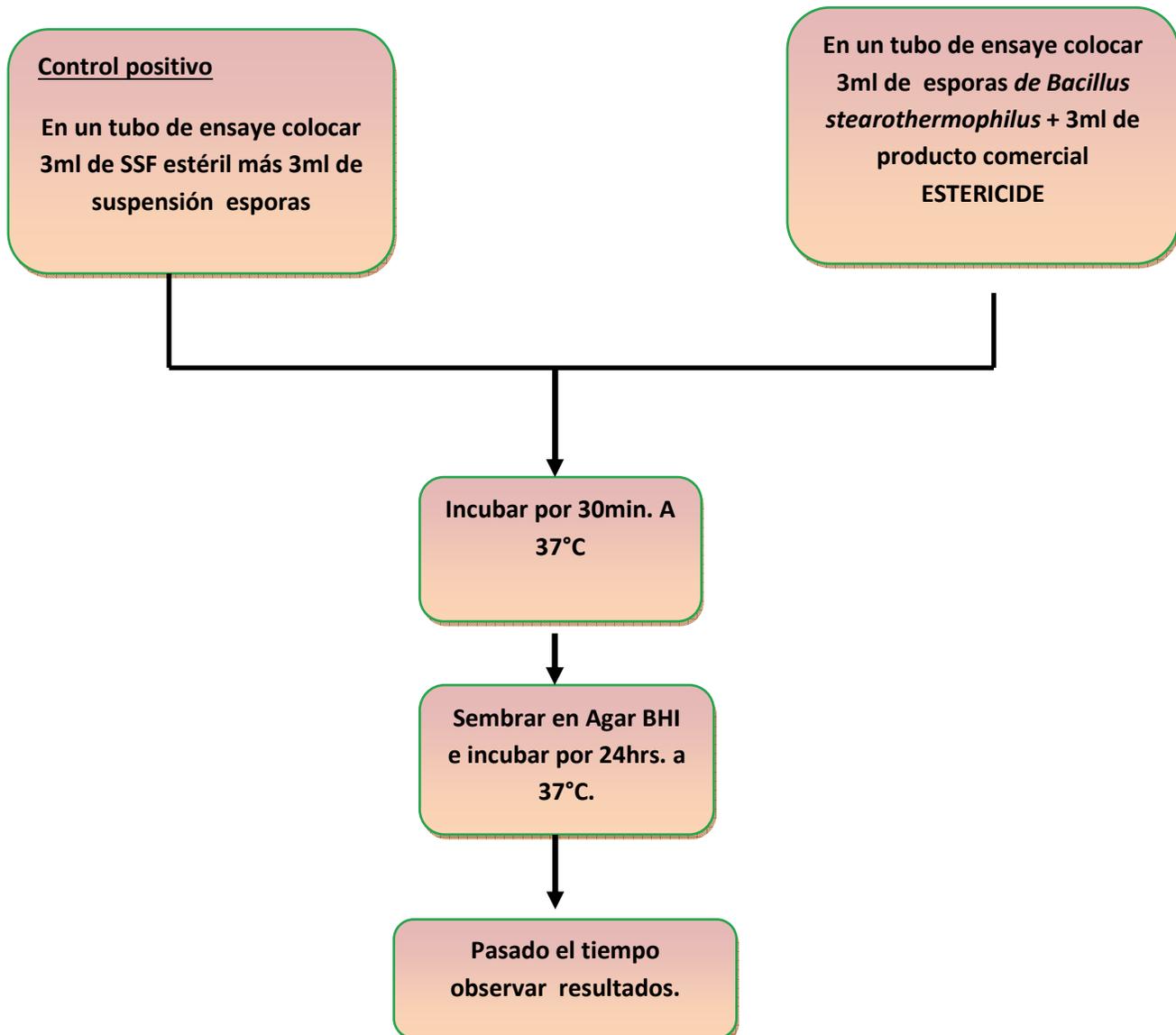
Una vez identificadas las bacterias esporuladas se llevaron a cabo los ensayos. Y es importante mencionar que todo el material utilizado se esterilizó.

7.5. ENSAYO 1. Esporas versus Estericide Qx. y SoluVet concentrado.

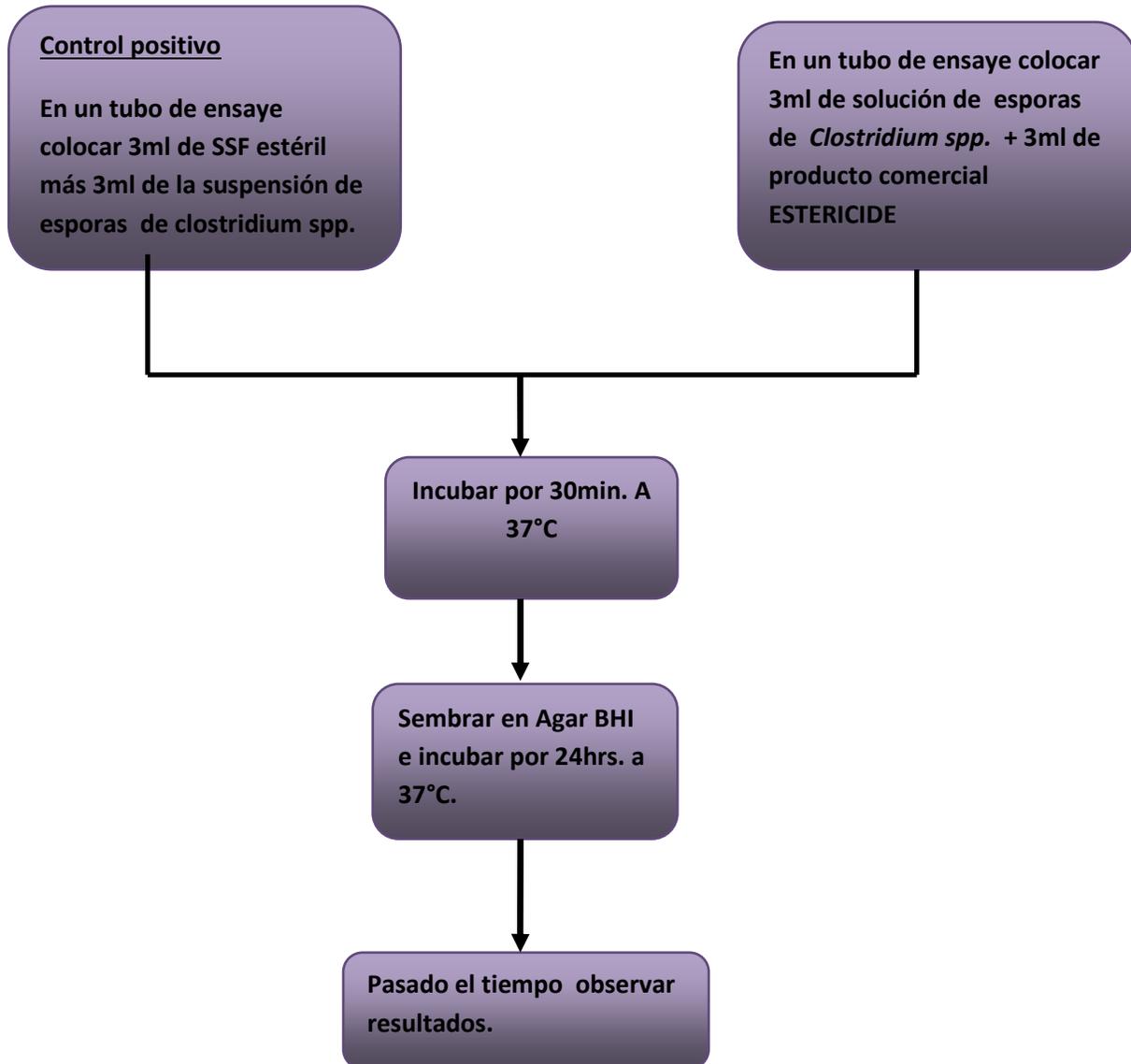


La metodología mencionada se realiza para observar si de verdad los productos (ESTERICIDE Y SOLUVET) presentan algún efecto en las esporas. Para poder realizar el segundo ensayo que será ahora trabajar con diferentes diluciones de los mismos productos desinfectantes.

7.6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA *Bacillus stearothermophilus*.



7.7. DIAGRAMA DE FLUJO PARA *Clostridium spp.*



Para el ensayo con **SoluVet** se realiza el mismo procedimiento anterior lo único que cambia es el producto comercial utilizado para cada prueba.

Es muy importante mencionar que estas pruebas se realizaron por triplicado para confirmar los resultados.

7.8. ENSAYO 2 EN MICROPLACA, ESPORAS CON EL PRODUCTO A DIFERENTES DILUCIONES.

Se trabaja con los tubos que contenían a las esporas (de *Clostridium spp.* y *Bacillus stearothermophilus*), para lo cual se preparó previamente caldo BHI a doble concentración, y solución salina fisiológica, agua destilada estéril y el material todo previamente estéril, es muy importante mencionar que las esporas se estandarizaron al 0.5 del nefelómetro de McFarland y estas se prepararon 24 horas antes de realizar la prueba.

Con la ayuda de una micropipeta y puntas estériles se realizó primero la dilución de los productos SoluVet y Estericide Qx, esto bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar y se procedió a realizar la prueba como se describe a continuación:

Tenemos una microplaca de 96 pozos horizontalmente esta enumerada del **1** al **12** y verticalmente de la **A-H** de los cuales se utilizaron dos hileras completas horizontalmente para cada ensayo.

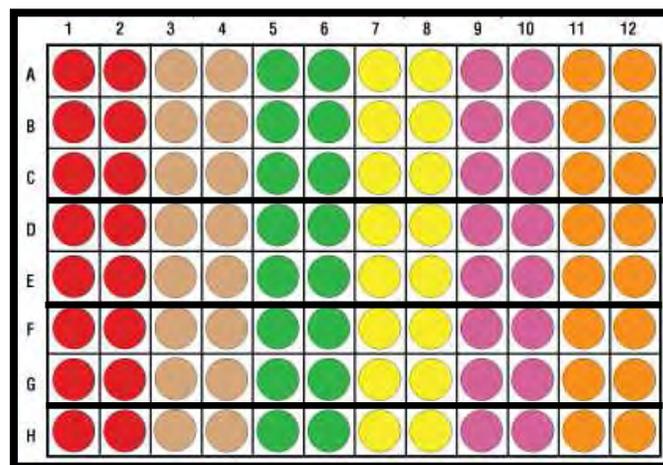


Figura 5. Esquema de microplaca

LAS DILUCIONES SE HICIERO DE LA SIG. MANERA

En la primera microplaca se trabajó con *Bacillus stearothermophilus*.

En el pozo 1A se agregan 100 ul del producto Estericide Qx.

Del pozo 2A al 9A se va a agregar 100 ul de SSF, en el pozo 2A se agrega 100 ul del producto Estericide concentrado, de este pozo se toman 100 ul y se pasan al pozo 3A se



mezcla bien y se vuelven a tomar 100 ul y se pasa al pozo 4A y este procedimiento se sigue hasta el pozo 9 aquí se toman los 100 ul y se desechan de esta manera lo que se hace es la dilución del producto

En el pozo 10A se va a poner solo 100 ul de caldo BHI doble concentración y 100 ul esporas de **Bacillus** (control positivo)

En el pozo 11A se va a colocar 100 ul de caldo BHI doble concentración mas 100 ul de SSF. (Control negativo)

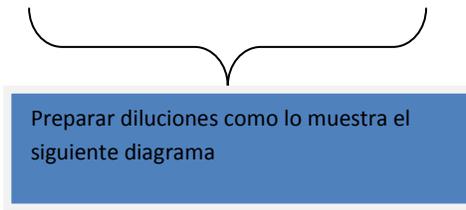
En el pozo 12A 100 ul de BHI doble concentración + 100microlitros de Estericide (blanco).

Por último al pozo 1A hasta el pozo 9A se les agregan 100 microlitros de la solución de esporas de **Bacillus**.

Al final todos los pozos contenían 200 microlitros de ahí se dejó incubar 15 min. A 37°C en la estufa bacteriológica

TABLA No. 4 Preparación del ensayo de dilución en placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 control (+)	11 control (-)	12 Blanco
A	100ul. De Estericide concentrado + 100ul de solución de esporas	100ul. De Estericide concentrado +100ul de SSF. Estéril								100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De solución de esporas	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De SSF. Estéril.	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De Estericide



Este procedimiento mencionado se realizó de la misma manera para el producto Soluvet en la misma microplaca solo que en la fila E y se ocuparon todos los pozos horizontalmente es decir del pozo E1 hasta E12 así como también la solución de esporas de **Bacillus**.

Se utiliza otra microplaca donde se trabaja con **Clostridium spp.** Y se hace el mismo procedimiento mencionado para **Bacillus** y de igual manera se utilizaron dos hileras de la microplaca para los dos diferentes productos (Estericide y Soluvet). Aquí se utilizaron desde el pozo A1 hasta A12 para el producto de Estericide y el pozo C1 hasta C12 para Soluvet.

Previamente se prepararon 4 placas de agar BHI, las cuales se rotularon con un marcador de la siguiente manera:

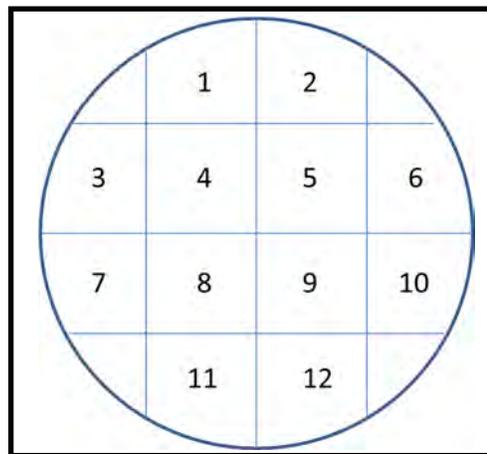


Figura No.6 Rotulación de las cajas petri.

Teniendo todo este material preparado se saca la microplaca y se procede a lo siguiente: En una placa de BHI se colocará una gota de la solución de cada pozo en el cuadro correspondiente de acuerdo al número de cada pozo, se pondrá en el cuadro etiquetado con el mismo número esto para que se lleve un buen control, cada placa será para cada ensayo de los que se realizaron y estos son:

- Soluvet con esporas de **Bacillus stearothermophilus**.
- Estericide con esporas de **Bacillus stearothermophilus**.
- Soluvet con esporas de **Clostridium spp.**
- Estericide con esporas de **Clostridium spp.**

Esto con la finalidad de observar si hay o no crecimiento a diferentes concentraciones de los productos Soluвет y Estericide y por lo tanto saber si estos productos tienen efecto ante esporas de *Bacillus* y *Clostridium*.

Todo bajo condiciones de esterilidad como se muestra en las siguientes imágenes.



Figuras 7, 8,9 y 10. (fig. 7 de arriba izquierda a fig.8 derecha y debajo fig. 9 izquierda y fig. 10 derecha) Sembrado en placa previamente rotulada de Agar BHI para observar el efecto a diferentes concentraciones de los productos estudiados.

Ya sembradas las placas de agar BHI se incubaron por 24 hrs. A 37°C

El paso que sigue es preparar la placa para que se pueda realizar la prueba colorimétrica de Mosmann y esto se realizó de la siguiente manera.

7.10. PRUEBA DE MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)

En esta técnica se realiza una lectura colorimétrica adicionando a todos los pozos ocupados de la microplaca 5ul de reactivo de reactivo (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazolium) (MTT) el cual presenta un color amarillo (oxidado) se incuba de 15 a 30 min., si no hay presencia bacterias viables en el pozo el reactivo de MTT permanecerá de color amarillo, mientras que si hay bacterias viables el MTT va a virar a color violeta (reducido).



El procedimiento que se llevo a cabo se explica a continuación.

De la placa que se tenía para las esporas de *Bacillus stearothermophilus* se hace lo siguiente ; de la línea **A** se va a tomar 100 ul, del pozo 1A al 12A y se va a colocar en la línea **C** (esto corresponderá a el ensayo de Estericide con Bacillus) y de la línea **E** se realizara el mismo procedimiento y colocarlo en la línea **F** (esto pertenecerá al ensayo de soluvet con Bacillus)

Ahora se trabajará con la línea **C** y **F** las cuales cada pozo ya contienen 100ul a estos se le van a agregar 100 ul de caldo BHI a doble concentración a todos los pozos, se dejará incubar 24 horas a 37°C, esto para promover el crecimiento de las esporas, si las hay.

La microplaca quedara como se muestra en la tabla No. 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 control (+)	11 control (-)	12 blanco
A	100ul. De Estericide concentrado +100ul de solución de esporas de <i>Bacillus</i>	100ul. De Estericide concentrado +100ul de SSF. Estéril								100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De solución de esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De SSF. Estéril.	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De Estericide
B												
C	100ul de 1ª	100ul de 2A	100ul de 3A	100ul de 4A	100ul de 5A	100ul de 6A	100ul de 7A	100ul de 8A	100ul de 9ª	100ul de 10ª	100ul de 11A	100ul de 12A
D												
E	100ul. De Soluvet concentrado + 100ul de solución de esporas de <i>Bacillus</i> .	100ul. Soluvet concentrado +100ul de SSF. estéril								100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De solución de esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De SSF. Estéril.	100ul. De caldo BHI doble concentración + 100ul. De Soluvet
F	100ul de 1C	100ul de 2C	100ul de 3C	100ul de 4C	100ul de 5C	100ul de 6C	100ul de 7C	100ul de 8C	100ul de 9C	100ul de 10C	100ul de 11C	100ul de 12C

Tabla No. 5 Tabla representativa de cómo quedara la microplaca.

A las 24 horas se va a realizar la lectura.

A cada pozo de la línea **C** y **F** se le van a agregar 5 ul de reactivo de MTT previamente estéril y se dejara incubar por 30min a 37°C.

Pasado el tiempo se va a observar si hay o no cambio de color, esto se debe a que esta prueba es colorimétrica, es decir, que si hay crecimiento de bacterias, el pozo cambiará de color amarillo a morado el cual es indicativo de una prueba positiva

El mismo paso se realizara para la segunda placa que es la del ensayo de *Clostridium spp.* Con soluvet y Estericide. Respetando el marcaje mencionado cuando se preparo la microplaca para *Clostridium spp.*



Figura No. 11, 12, 13,14.Ensayo con microplaca de clostridium spp. Por último se preparan las muestras de esporas para llevarlas a observar por la técnica de tinción negativa, por microscopia electrónica de transmisión (MET).

7.11. MICROSCOPIA ELECTRONICA

- Vamos a tener las muestras de las esporas con agua estéril en los tubos con tapón de rosca
- Estandarizar cada una de las muestras al 0.5 del nefelómetro de Mac Farland
- En tubos de ensaye estériles con tapón de rosca colocar:



---3ml de solución de esporas de *Bacillus stearothermophilus* + 3ml de producto Soluvet concentrado.

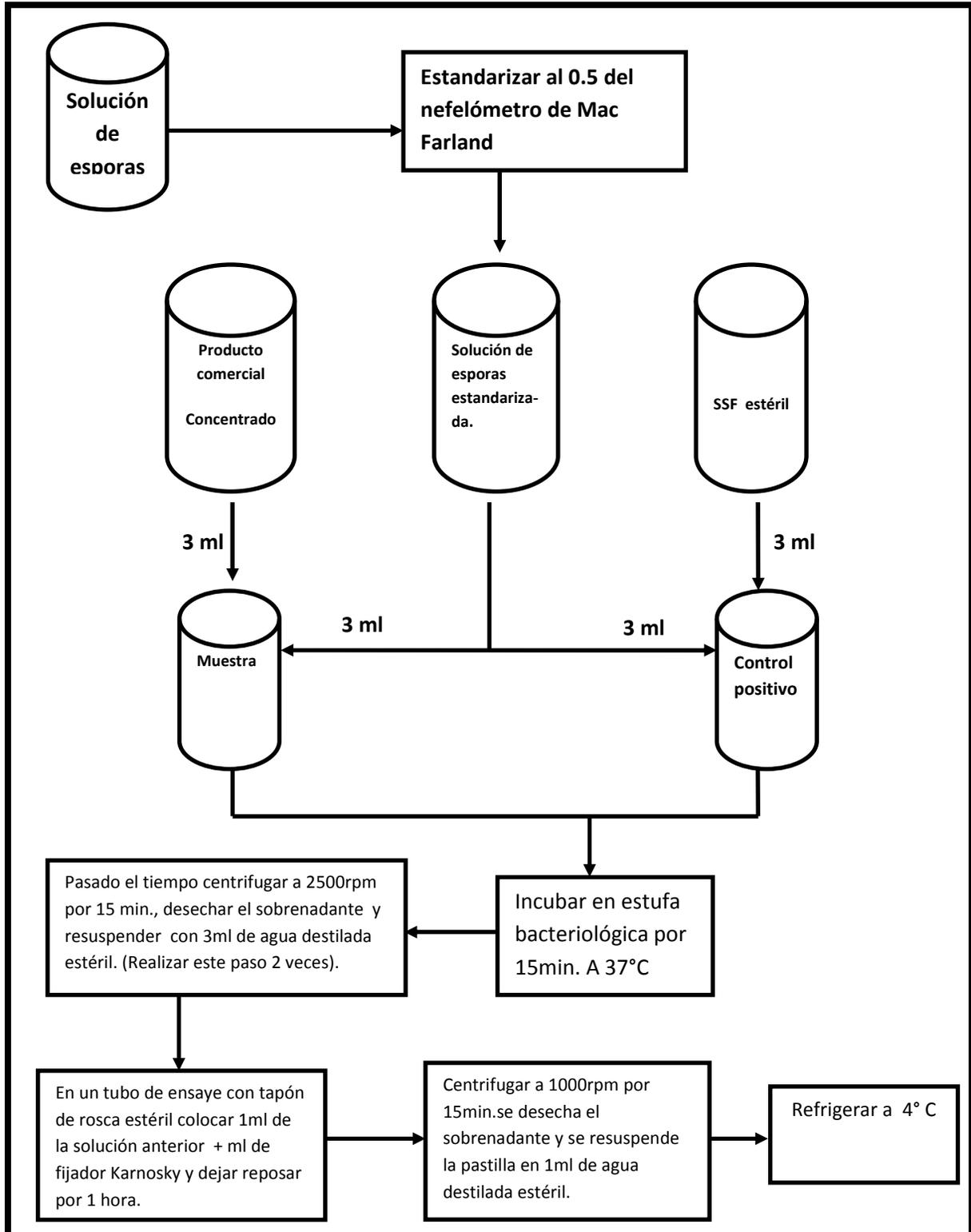
---3ml de solución de esporas de *Bacillus stearothermophilus* + 3ml de producto Estericide concentrado.

---3ml de solución de esporas de *Clostridium spp.* + 3ml de producto Soluvet concentrado.

---3ml de solución de esporas de *Clostridium spp.* + 3ml de producto Estericide concentrado

- Los controles positivos son en tubo de ensaye estéril con tapón de rosca colocar 3ml de la solución de esporas estandarizada al 0.5 del nefelómetro de McFarland + 3ml de SSF estéril. Esto para cada uno de las muestras de esporas es decir se tiene 2 tubos.
- Todos los tubos preparados anteriormente se incuban durante 15min. en estufa bacteriológica a 37°C.
- Pasado el tiempo de incubación centrifugar los 6 tubos a 2500 rpm. Durante 15min. , desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml.de agua destilada estéril.
- Centrifugar a 2500 rpm por 15 min. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml de agua destilada estéril.
- Centrifugar a 2500 rpm por 15 min. Desechar el sobrenadante.
- Agregar en tubos de ensaye con tapón de rosca estériles 1ml de la muestra de esporas + 1ml de reactivo de Karnosky y dejar reposar durante una hora. este paso se hará para todos los tubos es decir se tendrán 6 tubos contando a los controles positivos.
- Los 6 tubos se van a centrifugar a 1000 rpm durante 15min. se elimina el sobrenadante y se resuspende la pastilla en 1ml de agua destilada estéril.
- Se guarda en refrigeración a 4°C

7.1.2. DIAGRAMA: Proceso de preparación de esporas para ser observadas en microscopio electrónico de Transmisión.



7.13. TECNICA DE TINCION NEGATIVA

- Una gota de esporas bacteriana se deposita sobre un papel parafilm, y se colocan dos rejillas con membrana para que se adsorba la muestra durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Se toman las rejillas y el exceso se absorbe con papel filtro y en seguida son teñidos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Las rejillas son recogidas y se absorbe el exceso de colorante y son secadas a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.
- Las muestras son observadas y fotografiadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEM 100X JEOL).

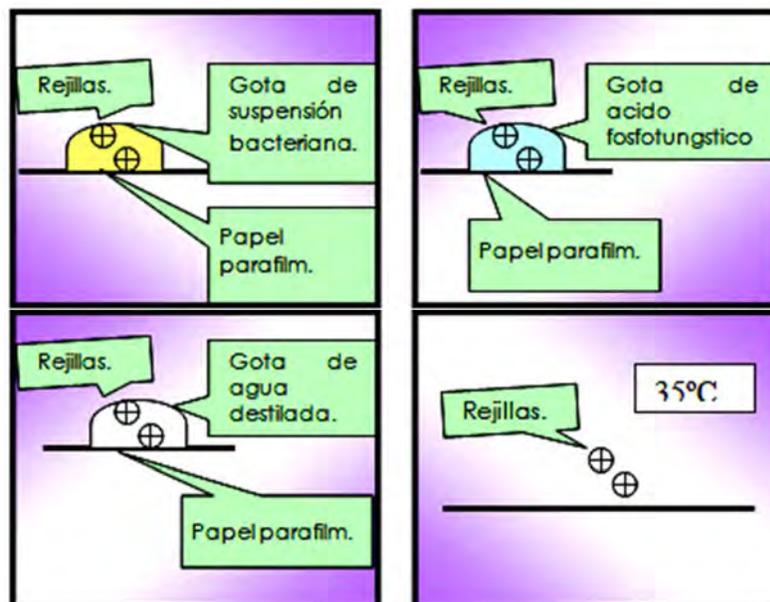


Figura No. 15 Técnica de tincion negativa.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento de *Bacillus stearothermophilus* en agar BHI.

Se observaron colonias finamente granulares, irregulares, blanquecinas, con un diámetro aproximado de 1 a 5mm.

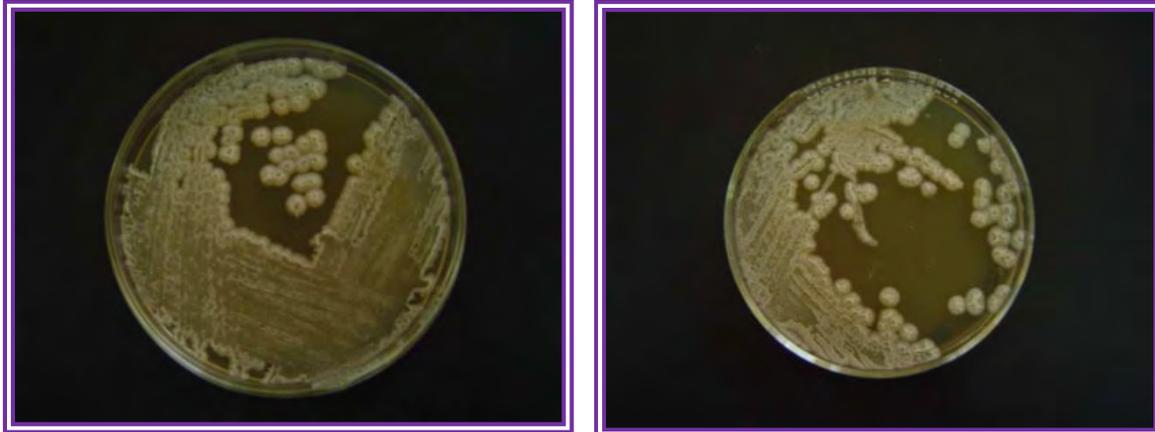


Foto No. 1 (izquierda) y 2(derecha) colonias de *Bacillus stearothermophilus* sembradas en agar BHI

8.1.2. TINCION DE GRAM

Se observaron bacilos Gram positivos, agrupados en filamentos y solos, como se observa en la foto No. 3.

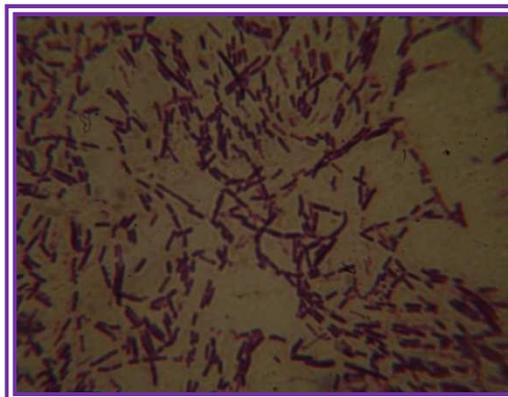
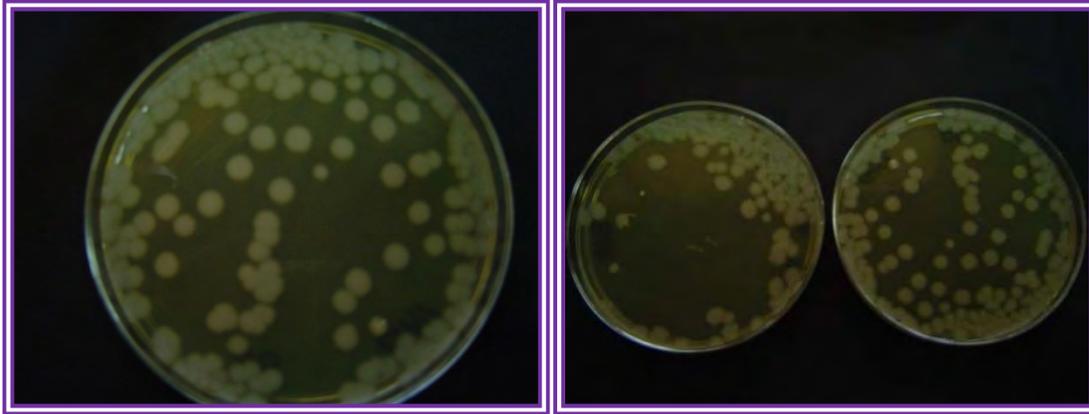


Foto No. 3. Tinción de Gram para el género de *Bacillus stearothermophilus*.

8.2. AISLAMIENTO DE *Clostridium spp.*

Se observaron colonias individuales, redondeadas, generalmente difundidas y tienen bordes, fimbriados o rizoidales.



Fotos No. 4 (izquierda) y 5(derecha) Colonias del género de *Clostridium spp.* Sembradas en agar BHI

8.2.1. TINCION DE GRAM

Se observaron bacilos Gram positivos, grandes (3-7 μm de longitud), con puntas redondeadas, agrupadas en filamentos y solas.

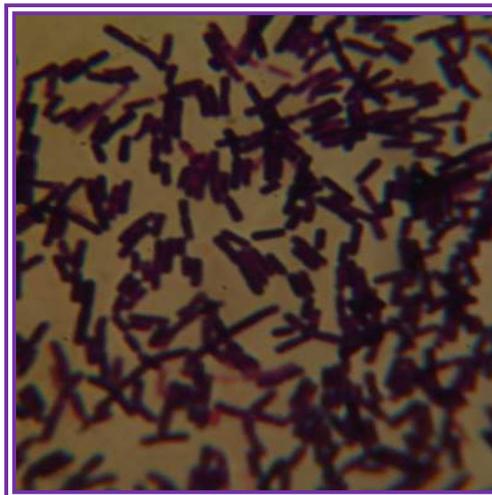


Foto No.6 Tinción de Gram para el género de *Clostridium spp.*

8.3. DIFERENCIACIÓN DE ESPORAS

Para realizar la diferenciación se realizó la tinción de Zhiel Nelsen que es una tinción específica para teñir esporas, A continuación se observan las esporas de los dos géneros y se pueden diferenciar por la forma ya que las esporas de *Bacillus stearothermophilus* (foto 7) se observan redondas, pequeñas y las de *Clostridium spp.* (Foto 8) Se observaron ovoides y más grandes.

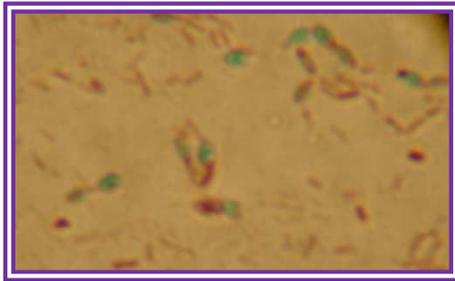


Foto No.7 Espora de *Bacillus stearothermophilus*

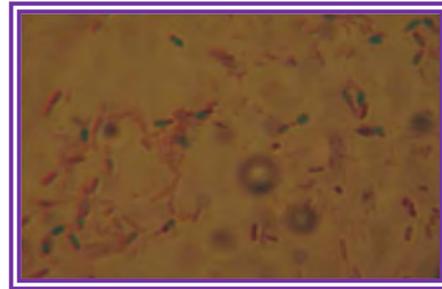


Foto No.8 Esporas de *Clostridium spp.*

8.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL GÉNERO DE *Bacillus* .

Estas pruebas se realizaron para corroborar que se estaba trabajando con el género *Bacillus*. Frente a la catalasa presentó una reacción positiva, en el medio de SIM presento motilidad positiva, indol negativo y acido sulfúrico negativo. Fermento los siguientes azúcares: dextrosa y sacarosa. Ver figuras 16-21.

Tabla No. 6 Pruebas Bioquímicas Realizadas Para Identificar Al género *Bacillus*

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
CATALASA	+
SIM	-/-/+
NITRATOS	+
DEXTROSA	+
SACAROSA	+



Foto No. 9 Prueba de catalasa para *Bacillus stearothermophilus*

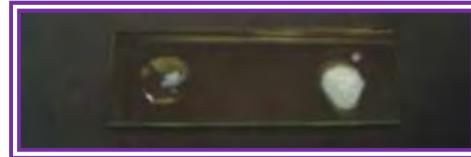


Foto No. 10 prueba de catalasa para *bacillus*



Foto No. 11 Prueba de SIM

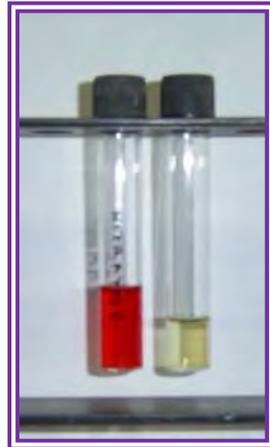


Foto No.12 prueba de Nitratos

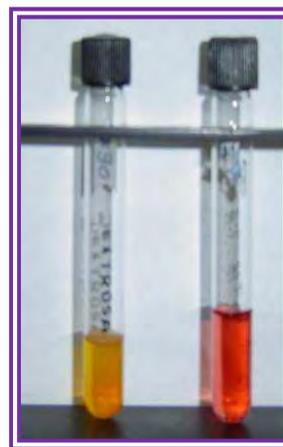


Foto No. 13 prueba de Dextrosa



Foto No. 14 prueba Sacarosa

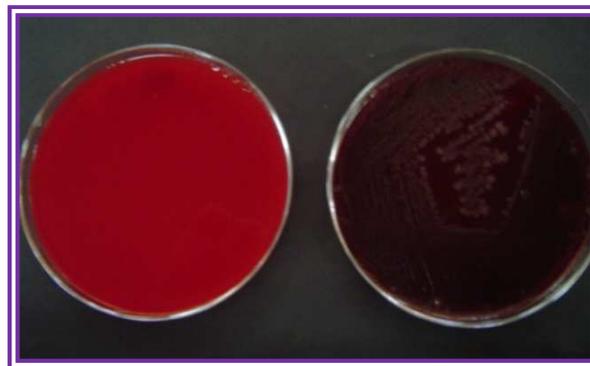


Foto No.15 Crecimiento de *Bacillus stearothermophilus* en agar sangre.

8.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DEL GÉNERO DE *Clostridium spp.*

Frente a la catalasa presento una reacción negativa, un SIM positivo, fermento los siguientes azúcares: dextrosa, lactosa, sacarosa y maltosa, presentó una B- hemolisis al ser sembrada en agar sangre, en agar yema de huevo observar figuras de la 22 a la 28.

Tabla No. 7 Pruebas bioquímicas realizadas para identificar esporas bacterianas del género de *clostridium spp.*

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO
CATALASA	NEGATIVO
SIM	POSITIVO
DEXTROSA	POSITIVO
LACTOSA	POSITIVO
SACAROSA	POSITIVO
MALTOSA	POSITIVO

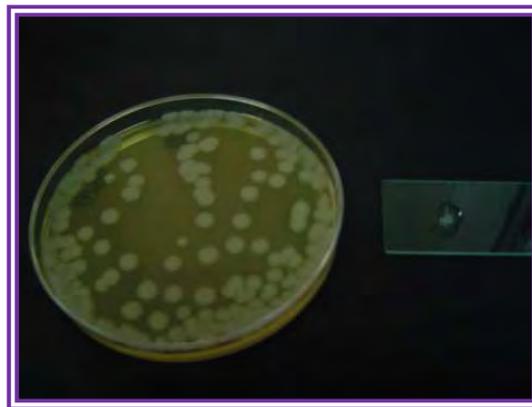


Foto No.16 Prueba de catalasa para *clostridium spp.*

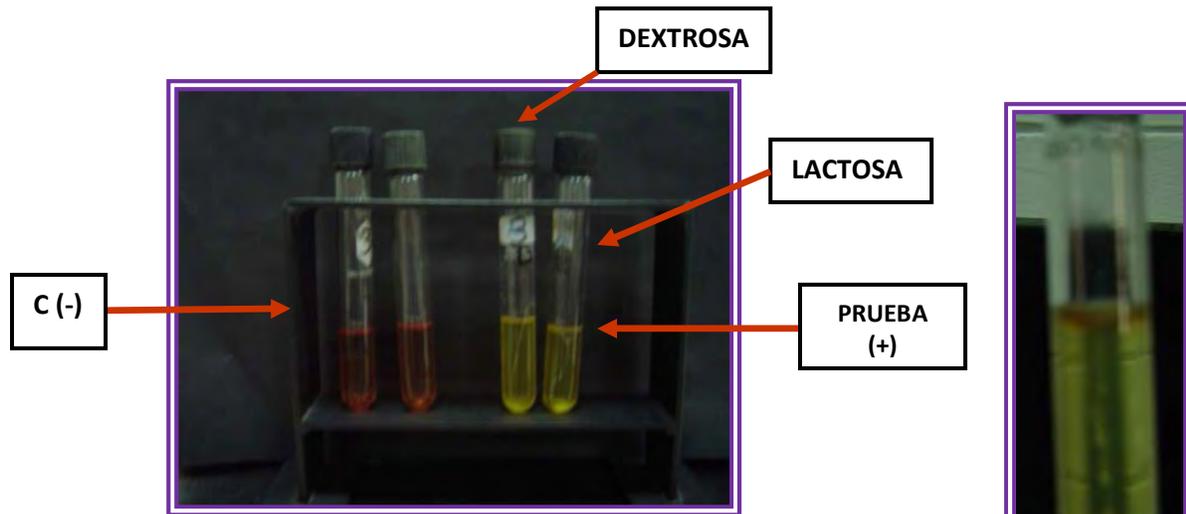


Foto No. 17 dextrosa (izquierda), lactosa (derecha) color amarillo prueba positiva.

Foto No. 18 SIM (Motilidad) Prueba positiva crecimiento en estrías vellosas.

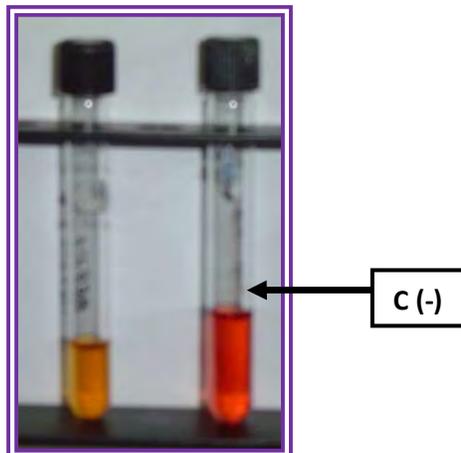


Foto No.19 Sacarosa color amarillo prueba positiva

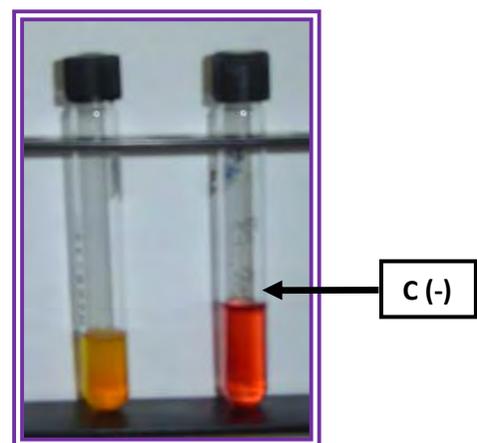


Foto No. 20 Maltosa color amarillo prueba positiva

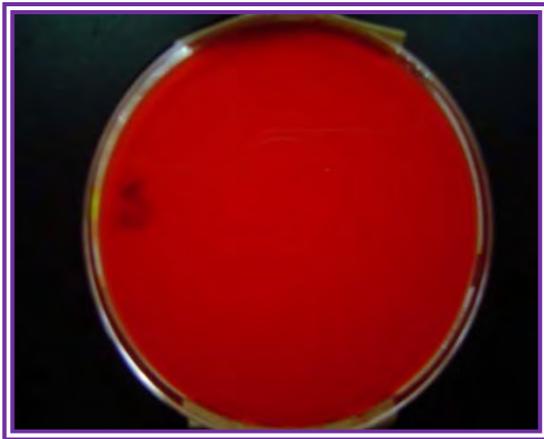


Foto No. 21 Placa de Agar sangre sin sembrar

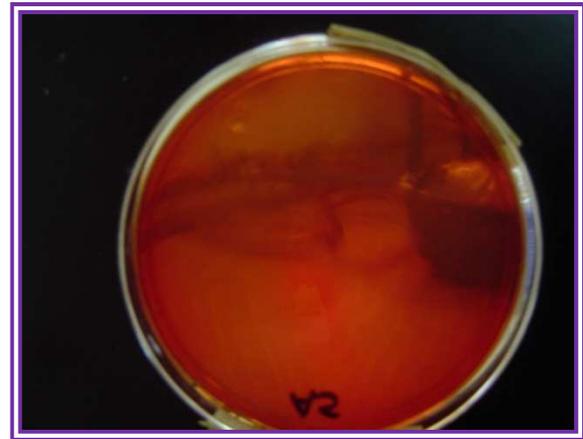


Foto No. 22. Crecimiento de clostridium en Agar sangre

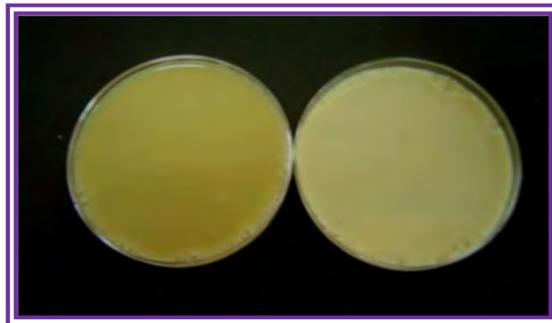
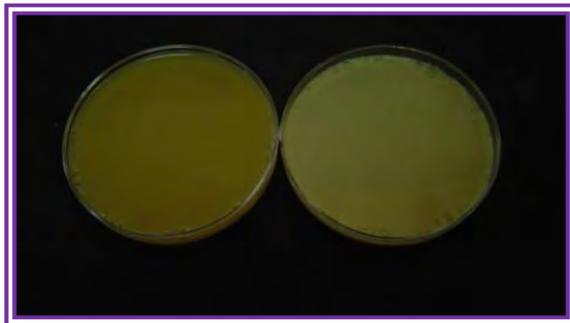


Foto No. 23 (izquierda) y No. 24(derecha) Crecimiento de *Clostridium spp.* en agar yema de huevo.

8.6. RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO (ensayar la espora con el producto (Estericide Qx y SoluVet) a volúmenes altos) ambos productos concentrados.

Para el caso de *Bacillus stearothermophilus* se observa que no hay crecimiento con ninguno de los 2 productos utilizados, Para *Clostridium spp.* Se observa que con SoluVet existe crecimiento abundante y con Estericide hay muy poco crecimiento. Cabe mencionar que aquí los productos no fueron diluidos por lo tanto se trabajó concentrado ambos productos, y para tener una mayor certeza se realizaron controles positivos en donde no hay crecimiento como se observa en las fotos 25-28.

Tabla No.8 Resultados del primer ensayo

<i>Bacillus</i> + SSF Control +	Con crecimiento
<i>Bacillus</i> + SoluVet	sin crecimiento
<i>Bacillus</i> + Estericide	sin crecimiento
SSF + <i>Clostridium spp.</i>	control positivo
<i>Clostridium</i> + SoluVet	con crecimiento
<i>Clostridium</i> + Estericide	con muy poco crecimiento

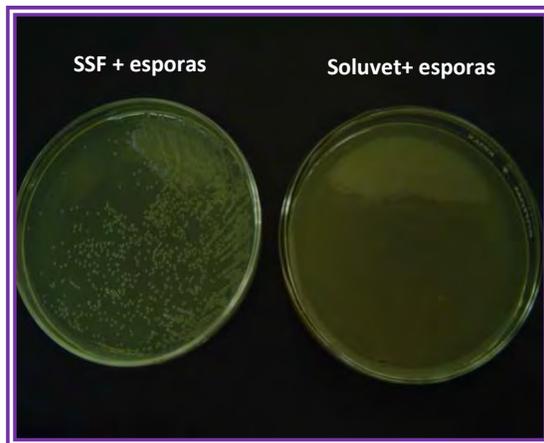


Foto No. 25 esporas de *Bacillus* frente a SoluVet concentrado. Se observa lado izquierdo control positivo.

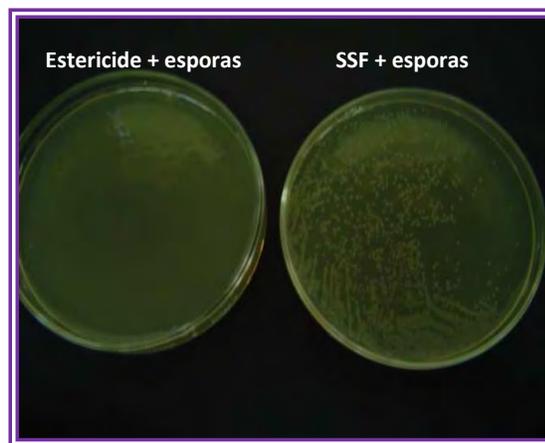


Foto No. 26 esporas de *Bacillus* frente a Estericide concentrado. Observar lado derecho control positivo.



Foto No. 27 *clostridium spp.* Frente a SoluVet concentrado.



Foto No.28 *Clostridium spp.* Frente a Estericide concentrado.



8.7. RESULTADOS DEL SEGUNDO ENSAYO (ensayar la espora con los productos a diferentes concentraciones a volúmenes pequeños) En microplaca.

En la siguiente tabla se observan los resultados generales obtenidos en las microplacas para los dos desinfectantes versus esporas de *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium spp.* Se observa que para *Bacillus stearothermophilus* en el pozo número 1 no hay crecimiento y el producto es Estericide, con SoluVet *Bacillus* presenta crecimiento, para el caso de *Clostridium spp.* Hay crecimiento en los pozos con el producto de SoluVet y con Estericide no hay crecimiento. Cabe mencionar que en los pozos numero 1 el producto no está diluido. Y en los siguiente pozos ya comienzan las diluciones, hasta el pozo numero 9, ya que el pozo numero 10 pertenece a un control positivo por lo tanto debe de haber crecimiento, en el pozo número 11 es el control negativo por lo tanto no debe de haber crecimiento y el pozo 12 es el blanco y aquí también debe de haber crecimiento.

Tabla No. 9 Resultados Generales de la microplaca

POZOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Bacillus</i> con Estericide	s/c	c/c	s/c	s/c								
<i>Bacillus</i> con soluvet	c/c	s/c	s/c									
<i>Clostridium</i> con Estericide	c/c	s/c	s/c									
<i>Clostridium</i> con soluvet	c/c	s/c	s/c									
s/c = sin crecimiento												
c/c = con crecimiento												

8.7.1. Microplaca del ensayo para *Bacillus stearothermophilus*.

Placa para el ensayo de *Bacillus* (foto. 29) sin incubar, se observa en todos los pozos el color amarillo (MTT oxidado). En la foto 30 observamos la placa que cambio de color ahora el color es purpura esto nos indica que la bacteria al metabolizar los nutrientes del medio, produce enzimas, una implicada es la deshidrogenasa, la cual reduce el MTT cuando las bacterias o las células eucariotas están vivas y activamente metabólicas.



Foto No. 29 Microplaca sin reactivo MTT



Foto No. 30 Microplaca con Reactivo MTT después de la incubación

8.7.2. PLACAS DE AGAR BHI REPRESENTANDO LOS RESULTADOS DE LA MICROPLACA PARA *Bacillus*.

Se puede observar que en el número 1 no hay crecimiento y este corresponde a ambos productos concentrados. Y se observó que en los otros cuadros ya hay crecimiento.

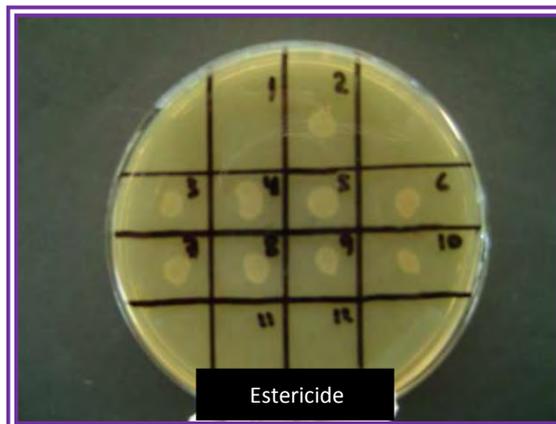


Foto No. 31 Placa agar BHI con Estericide

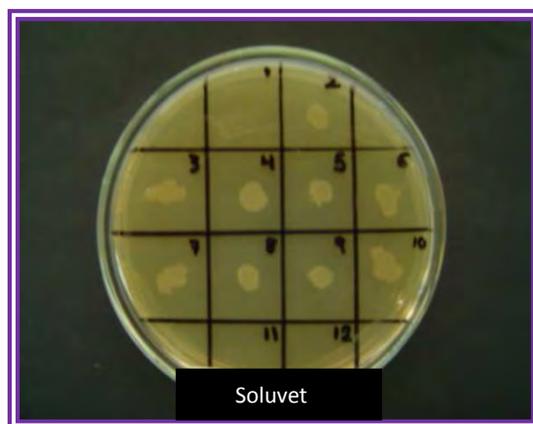


Foto No. 32 Placa agar BHI con SoluVet

8.7.3. MICROPLACA DEL ENSAYO PARA CLOSTRIDIUM.

Se observa la foto 33 la microplaca sin incubar y la foto 34 después de la incubación nótese el cambio de color.



Foto No. 33 microplaca sin incubar para *clostridium spp.*



Foto No. 34 microplaca del ensayo después de la incubación para *clostridium spp.*

8.7.4. PLACAS DE AGAR BHI REPRESENTANDO LOS RESULTADOS DE LA MICROPLACA PARA *Clostridium spp.*



Foto No. 35 Placa de agar BHI con SoluVet para *Clostridium spp.*

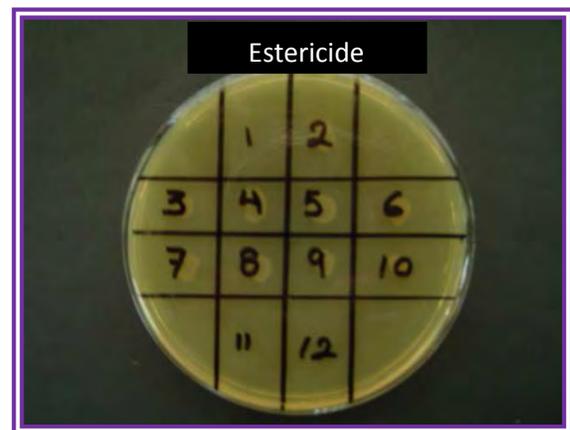


Foto No. 36 Placa de agar BHI con Estericide para *Clostridium spp.*

8.8. OBSERVACIONES OBTENIDAS EN MICROSCOPIO ELECTRONICO

Las siguientes fotos nos explican los resultados con ambas bacterias usadas en este trabajo.

8.8.1. Microfotografías de *Bacillus stearothermophilus*.

Foto (37) microfotografía de Espora; *Bacillus stearothermophilus* tratada con SSFE y teñida con ácido fosfotúngstico. **Amplificación** de 25,000 aumentos. Nótese una sola estructura central, electrodensa.

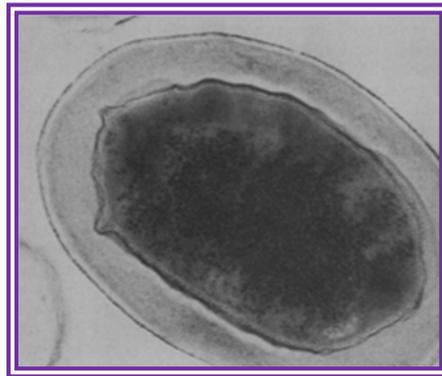


Foto No. 37 Espora de *Bacillus stearothermophilus* sin tratar.

Foto 38 Bacillus versus Estericide. 25,000 aumentos 0.825mm- 24.5mm. Microfotografía Electrónica de Transmisión de una espora de *Bacillus stearothermophilus* tratada con **Estericide**. Nótese la fragmentación de la corteza del Peptidoglicano (Cp) en tres estructuras. La capa cortical (Cc) bien definida, sin protuberancias y electrodensa en la parte superior.

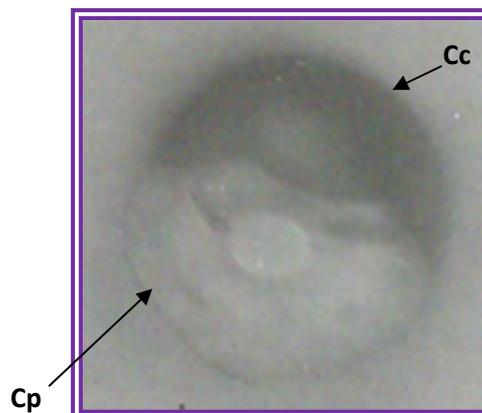


Foto No. 38. *Bacillus stearothermophilus* versus Estericide.

Foto 39 *Bacillus* versus SoluVet. 25,000 aumentos 0.825- 24.5 mm Microfotografía Electrónica de Transmisión de una espora de *Bacillus stearothermophilus* tratada con SoluVet. Nótese la corteza del Peptidoglicano (Cp) totalmente amorfa. La capa cortical (Cc) lesionada en dos de sus extremos.

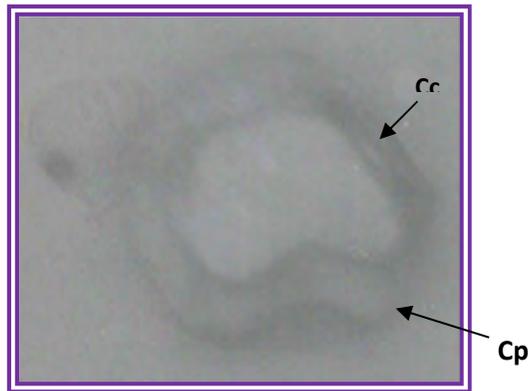


Foto No.39 *Bacillus stearothermophilus* versus SoluVet.

8.8.2. MICROFOTOGRAFÍAS DE *Clostridium* spp.

Foto 40 Espora *Clostridium* versus SSF 25,000 aumentos 24.5 mm=0,825 nm., podemos observar una espora de *Clostridium* spp., (control negativo), se aprecia un abultamiento en la zona central, indicándonos el probable inicio de la germinación, en la parte inferior una zona electrodensa y en conjunto una forma bacilar (flecha) en el interior de la espora.

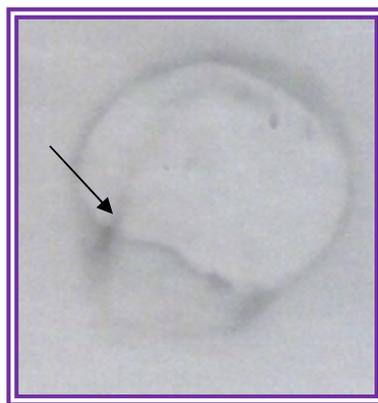


Foto No. 40 espora de *clostridium* versus SSF

Foto 41 *Clostridium* versus SoluVet 15,000 aumentos, podemos apreciar un redondamiento de la espora, pareciera que se hubiese detenido la germinación, ya que no se observa la misma estructura bacilar (flecha) que la tratada con SSF.

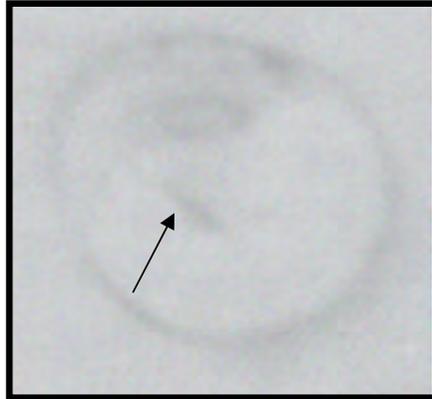


Foto No. 41 *Clostridium* versus SoluVet

Foto 42 Espora de *Clostridium* versus Estericide 15,000 aumentos. 20 mm=1.2 nm, podemos observar en el interior de la espora una estructura intermedia, más abultada en uno de sus extremos y más angulado en el contrario (flecha), estas esporas fueron tratadas con Estericide Qx con 40 ppm, según el trabajo de Reyes et al. 2012, la SES actúa en la corteza del Peptidoglicano de la espora inactivándola.

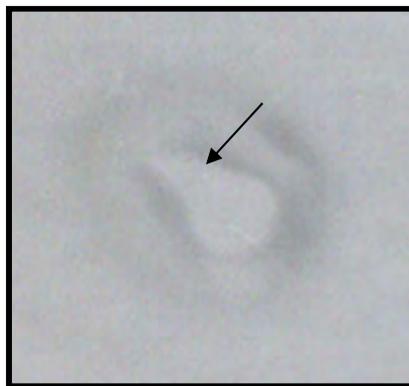


Foto No. 42 Espora de *clostridium* versus Estericide.



9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Las Soluciones Electrolizadas de Superoxidación (SES) de tercera generación, tienen muchas ventajas sobre las antecesoras que eran ácidas (pH 2.0) o alcalinas (pH 9.0), con estabilidades muy reducidas (30 horas) lo que originaba que su producción se hacía in situ. Las actuales tienen un pH neutro (7.0) con estabilidad de 18-24 meses y sin efecto tóxico y/o corrosivo sobre tejidos, aparatos y equipos médicos que requieren antisepsia y esterilización (endoscopios) respectivamente.

La cepa de *Bacillus stearothermophilus* fue obtenida de una ampolla de Sterikon e identificada por características coloniales en medios de cultivo, tintoriales y pruebas bioquímicas según lo indica el manual Bergey's. Ver fotos 1-3, 9-14.

Para la cepa de *Clostridium spp.*, fue aislada de una muestra de tierra y sembrada en agar Cooked-meat estéril, incubada a 37 °C por 24 horas y transferida a placas de agar sangre en atmósfera de anaerobiosis (Jarra Gaspak), se caracterizaron por pruebas bioquímicas y de crecimiento en medio de cultivo según lo indica el manual Bergey's. Ver fotos 4-6, 16-20.

Para ambas cepas, sus colonias en agar sangre (hemólisis), agar yema de huevo, agar BHI, tinciones de Gram y esporas permitieron establecer que se estaba trabajando con las bacterias requeridas ver fotos (7 y 8), 15 (21-24).

En el primer ensayo con Estericide y Soluvet concentrados, se puede concluir que se inhibe el crecimiento de las esporas de *Bacillus stearothermophilus* cuando las esporas expuestas a ambos esterilizantes son colocadas en medio de cultivo, temperatura y atmósfera adecuada y apreciamos ausencia de crecimiento comparable al control no tratado, ver fotos (25-26).

Para el caso de esporas de *Clostridium spp.* expuestas a Estericide y Soluvet concentrados, el primero permitió un mínimo de crecimiento (5 colonias), mientras que con Soluvet el crecimiento fue abundante, Además de que en la microplaca para clostridium se observa la inhibición solo con el producto Estericide concentrado, este resultado no concuerda ya que Estericide tiene 40 ppm y Soluvet 60 ppm de activos, se debería de analizar si en este último no existió alguna interferencia en el procedimiento, como: no haber disuelto perfectamente las esporas antes del ensayo, el tiempo de exposición al agente inactivante, presencia de materia orgánica (proteína del medio de cultivo) etc. Al observar las esporas por microscopía electrónica de *Clostridium* tratadas con ambos desinfectantes, si se observan modificaciones estructurales, ver fotos (27-28 y 41-42).



El ensayo en microplaca y posteriormente el crecimiento en agar cuadrículado permitió corroborar la inactivación y/o crecimiento de bacterias vegetativas a partir de esporas tratadas con Soluciones Electrolizadas de Superoxidación (SES) ver fotos (29,30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36). Este mismo ensayo se corroboró usando la técnica de Mosmann, en la cual el reactivo es reducido por medio de enzimas en células y/o bacterias viables, distinguiéndose visualmente por un cambio de color (amarillo → violeta) y más adecuadamente por espectrofotómetro (530-560 nm) con un lector de placas. Ver fotos (29, 30 y 34).

En el segundo ensayo, con la SES (Estericide Qx y Soluvet) diluida (1:2 a 1:512), podemos apreciar que ninguna dilución logró inhibir las esporas de *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium spp*, este resultado es muy importante para obtener una inactivación adecuada. El resultado del primer ensayo con Estericide Qx concentrado (40 ppm) presenta alguna relación con el trabajo de Reyes et. al. 2012, en el cual uso SES de 60 ppm concentrado y una exposición de 15 min.

Con respecto a la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), no existen reportes en la bibliografía de esporas tratadas con SES y observadas con MET a excepción del trabajo presentado por Reyes et. al, 2012, en el que se demostró la actividad esporicida de la SES de 60 ppm de HClO, pH 7.0 y ORP de 840 mV., durante 15 min con esporas de *Bacillus subtilis* y 30 seg., con *Streptococcus faecalis*, donde la inactivación fue para ambas bacterias, usando diferentes tiempos de exposición ya que las esporas tienen capas que las protegen de manera natural contra la desecación y los rayos ultravioleta. Comparando la MET de esporas de *Bacillus stearothermophilus* control y esporas tratadas con SES se pueden apreciar los cambios morfológicos originados y la subsecuente falta de crecimiento en los medios de cultivo. Sin embargo para *Clostridium*, donde el efecto pareciera ser nulo, creemos que la causa podría ser una falla en el procedimiento, ya que soluvet al tener más concentración de HClO, debería de tener más efecto inhibitorio que Estericide Qx, esta bacteria es anaerobia y aun que se siguieron los procedimientos de cultivo lo más apegados a lo que dictamina la bibliografía creemos que en algo influyó en la no inactivación de la SES. Por los antecedentes de Reyes en 2012, la SES a base de HClO que es un fuerte oxidante de proteínas (11,40), la pared celular, en especial el peptidoglicano constituido de N-acetil murámico y N-acetil glucosamina con aminoácidos tanto en Gram positivos como en Gram negativos sería el punto inicial de su actividad, seguido de la membrana, que es abundante en proteínas. Con respecto a su acción en la inhibición de la síntesis de ácidos Nucleicos y/o proteínas, cuando la bacteria ha sido lisada estos pasan a ser importantes cuando el efecto es bacteriostático, pero no en efectos bactericidas. Con respecto a las esporas de *Bacillus subtilis*, ya se han reportado diferentes productos esporicidas (32, 36, 38, 39), en este trabajo podemos comparar los

efectos estructurales de la SES con las esporas de *Bacillus subtilis* (Fotos No. 43 y 44), la más afectada es la corteza del peptidoglicano (Cp), donde nuevamente las proteínas están presentes, además se observa una división y/o fragmentación de la misma, el resto de la espора se aprecia sin cambios. El HClO tuvo un efecto esporicida a la concentración y tiempo usado. Las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) son conocidas por su eficiencia en la desinfección y esterilización de instrumental, así como por ser auxiliares en el tratamiento de infecciones en tejidos. Las SES desde su aparición comercial han llamado mucho la atención por su efectividad en contra de bacterias, virus (41), hongos, esporas y micobacterias, así como por su baja toxicidad en tejidos (32) y fácil manejo en el almacenamiento, uso y desecho (42).

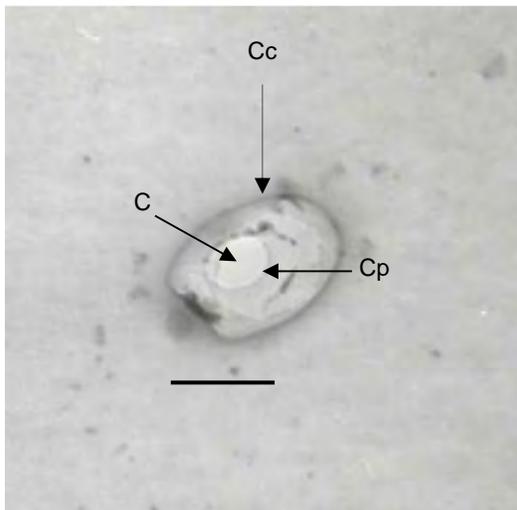


Foto No.43 Espora de *Bacillus subtilis*, control sometido a SSFE (0.85%), teñida con ácido fosfotúngstico y observada al microscopio electrónico de transmisión con 15 000 aumentos, la barra corresponde a 20 μm = 1.283 μm . Obsérvese la capa cortical (Cc) y la corteza de Peptidoglicano (Cp), el citoplasma (C) bien definido y homogéneo. Estas esporas fueron colocadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubadas a 37°C y se obtuvo crecimiento después de un periodo de 24 Hrs.

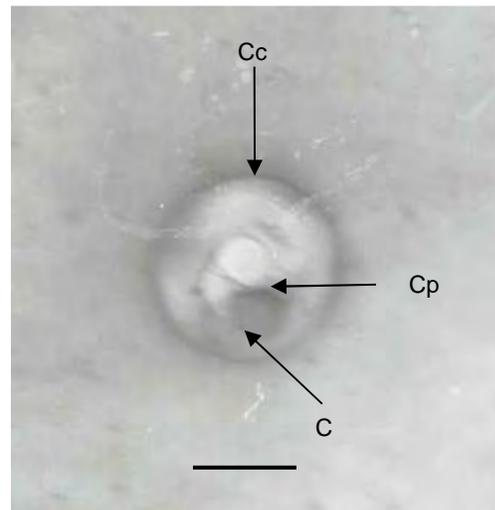


Foto No.44 Espora de *Bacillus subtilis* tratada con SES 60 ppm, teñida con ácido fosfotúngstico y observada al microscopio electrónico de transmisión con 15 000 aumentos, la barra corresponde a 20 μm = 1.283 μm . Obsérvese la capa cortical (Cc) sin cambio aparente, la corteza de Peptidoglicano (Cp) dividido en tres, el citoplasma (C) electrodensado en uno de sus fragmentos. Estas esporas fueron colocadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubadas a 37°C y no se obtuvo crecimiento después de un periodo de 24, 48, 72 y 96 Hrs.

El Acido Hipocloroso que es la base de la SES es extremadamente eficaz en la eliminación de todo tipo de patógenos y microorganismos, incluidas las esporas. Algunas características son:

1. Desinfectante moderno, que a pesar de su poder germicida, tiene un pH neutro.
2. No toxico.
3. No irritante.
4. No corrosivo.
5. No afecta las envolturas de hule o plástico, ni al metal.
6. No presenta sabor.
7. No presenta olor.
8. biodegradable.
- 9.No haga daño al medioambiente. (El Agua Electrolizada, el nuevo estándar en desinfección para ganadería Publicado el: 29/11/2011 Autor/es: ANSELMO FERNANDEZ).

La importancia de la actividad de la SES en bacterias esporuladas, es sin lugar a duda, en pacientes con diabetes, los cuales pueden desarrollar pie diabético, lo cual puede conducir a úlceras infectadas con diferentes bacterias, incluyendo esporulados, la SES se emplea en solución y en gel para este padecimiento.



Figura No. 16 Pie diabético tratado con SES

La SES también tiene importancia en la industria farmacéutica, sobre todo en el área de inyectables, ya que las esporas bacterianas pueden llegar hasta estos sitios, si no se tienen bien establecidos los protocolos de bioseguridad. El aire en estas áreas es filtrado a través

de filtros EPA, sin embargo se llegan a dar casos de contaminación por *Bacillus* spp., y la limpieza y desinfección por SES nebulizada elimina dicho riesgo ya que el tamaño de la gota puede llegar a los sitios donde la desinfección manual no llega.



Foto No. 45 Desinfección con SES en áreas críticas.

Es muy importante mencionar que la utilización de la SES en hospitales es de suma importancia ya que ayuda dentro de las áreas de antisepsia, desinfección de manos, desinfección de superficies inertes y esterilización en frío. Etc. por eso la importancia de conocer más acerca la SES.



10. CONCLUSIONES.

- La SES usada en este trabajo inhibió la germinación de esporas a formas vegetativas solo con *Bacillus stearothermophilus*.
- Solo la SES concentrada presentó actividad esporicida.
- La técnica de Mossman ayudó a corroborar el crecimiento y/o inactivación de esporas de *Bacillus stearothermophilus*.
- La Microscopía Electrónica de Transmisión permitió determinar los sitios de inactivación de la SES en *Bacillus stearothermophilus*.
- A pesar de que en el ensayo de dilución, *Clostridium spp.* solo mostró inhibición con el producto de Estericide; quedando en duda con respecto al producto Soluvet, ya que este es más concentrado. Y se corroboró en la Microscopía Electrónica de Transmisión ya que ahí sí se observaron cambios morfológicos.
- Debemos realizar estudios más precisos para establecer las incógnitas resultantes en este trabajo.
- Es de suma importancia mencionar que los productos utilizados efectivamente son utilizados como desinfectantes o esterilizantes, esto depende de la concentración del mismo producto. Y el sitio en el que actúa.

11. SUGERENCIAS.

- Es muy importante seguir realizando investigaciones con respecto a la SES, para así saber que otras ventajas tiene, así como sus desventajas.
- Sería interesante realizar más pruebas con esporas, enfrentándolas a los productos estudiados en este trabajo, como también se puede estudiar la amplia gama de productos que Esteripharma ofrece a la venta.



12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Microbiología de Frobister y Fuerst, Ed. Nueva Editorial Interamericana, decimo cuarta edición, México 1981. Pág. 164-199.
2. Paul de Kruif, (1981) Cazadores de Microbios, Ed. Mexicanos Unidos, México
3. Compendio de microbiología Practica, Ma. Guadalupe Vera Gabriel, Carlos Hernández Alcántara, Tesis UNAM Fes Cuautitlán, año 2003, pág. 17-44.
4. Tratado de Microbiología, Dr. Bob A. Freeman, et-al, segunda edición, Ed. Interamericana, México 1984, págs. 121-126, 627-659.
5. Sherris "Microbiología Medica", Kenneth J. Ryan C. George Ray, quinta edición, Ed Mc. Graw- Hill, Mexico 2010, pág. 37-48, 51-65.
6. Tratado de Microbiología con inclusión de Inmunología y Genética Molecular. Ed. Salvat editores S.A. 3ª. Edición México 1984. Pág. 1024-1032, 86-91, 573-578, 574-587.
7. Reparas F, Ariana P; et- al; Limpieza y Desinfección en el Hospital, Anales del Sistema Sanitario de Navarra (2000), vol. 23-suplemento 2.
8. Laín Entralgo (1983), Panorama Histórico de la Medicina Moderna y Contemporánea Ed. Científica Barcelona.
9. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica, Vicente Auxina Ruiz, Santiago Moreno Guillen, Ed. Medica Panamericana, México 2005, pág. 225-234.
10. Microbiología, Bacteriología, Características y Clasificación bacteriana, Virología, Características y Técnicas bioquímicas, Raquel Granados Pérez, María del Carmen Villaverde Paris. Pág. 22-25,45-53,142-145,170-175.
11. Cabello C, et- al Efecto de una solución electrolizada de superoxidacion con pH neutro sobre la infección del virus de la influenza A. en células MDCK. Revista instituto nacional de enfermedades respiratorias Mex. 2009;22 (4): 280-287.
12. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Jean F. 275-282, 470-483.
13. Microbiología Clínica , Profesor Guillen Prats, Ed. Medica Panamericana , 2006
14. Diagnostico Microbiologico Bailey y Scott, Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Weissfeld Ernest A. Trevino, Ed. Panamericana, Mexico 2007. 12a. edicion.
15. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg, Geo F. Brooks, MD, Janet S. Butel, et-al, Ed. El Manuel Moderno, Colombia 2007. Pág. 37-41.
16. "Panorama Histórico de la Medicina moderna y contemporánea". Ed. Científica Barcelona.
17. Alcamo. I.E. Fundamentals in Microbiology 3ª edición, Benjamín Cummings EU. (1991) pág. 733-760.
18. Practical Atlas For, Bacterial, Identificacion D. Roy Cullimore, Lewis Publishers EDD CRC Washington D.C. pág. 86, 87-91.2002



19. Álvarez Manríquez, C.I, Mendoza Elvira, S.E., Manual Básico de Bacteriología UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán México, (1994) pág. 31-43.
20. Block, S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation, 4ª edición William y Wilkins, USA (1995) pág. 65-77.
21. Breach M, R Esterilización, Métodos y control "El Manual moderno, México (1976) pág. 5-90.
22. Engler, R, Desinfectants, En Official Methods of analysis, Environmental Protection Agency, E.U. (1984) pág. 65-77.
23. Gonzales Gallardo Sofía, Hernández Baumgarten Elisep, et-al. (2003), Guía de Microscopia Electrónica UNAM. Fes. Cuautitlán D.F. pág. 15, 25,27.
24. Lemos Pastrana A. Microbiología General, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, Ed. CD. Derechos reservados 2005, pág. 33
25. Jurado Susana, Petruccelli M.A., Aplicaciones de la microscopia electrónica de transmisión en el Diagnostico Microbiológico, Analecta Veterinaria, (2005) pág. 18-24.
26. Arjona A.L. La importancia de evaluar los detergentes y sanitizantes durante los procesos de limpieza , Revista oficial de Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México volumen 6 numero 3 (2005)
27. Norma Oficial Mexicana, NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de análisis, Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germinicidas.
28. Tesis Determinación de la concentración ideal de esporas de *Bacillus stearothermophilus* como indicador biológico para el control de procesos de esterilización; Liliana Elisa Rosero Torres, Ángela María Zamora Ortiz, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. 2006.
29. Adolfo Chávez Gustavo, et.al.,(2004).Producción de Agua Electrolizada para la eliminación de microorganismos en lechuga. Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. 9pg. 91-100.
30. Flores Martínez Miguel A. (2008).Solución Electrolizada por selectividad iónica de pH neutro en el tratamiento de la enfermedad periodontal.Revista Mexicana de Odontología Clínica. pg. 16-22
31. Ibieta Zarco Blanca R., et.-al., (2008) Nueva opción analgésica en el tratamiento de Osteonecrosis mandibular secundaria al uso de bisfosfonatos. Revista de Cancerología. pg. 89-94.
32. Nachón García Francisco J., et.-al. (2008) Esterilización por inmersión. Estudio comparativo entre glutaraldehido al 2%, agua electrolizada superoxiada con pH neutro y solución electrolizada por selectividad iónica con pH neutro. Revista Medica U.V. pág. 5-10.
33. Yang H. et.-al. (2003) The effect of Ph on inactivation of pathogenic bacteria on Freshcut Lettuce by Dopping Treatment with Electrolyzed water. Journal of Food.
34. Efecto en la Estructura Bacteriana de una Solución Electrolizada de Superoxidación con pH Neutro. Reyes Garcés J. A., Solano Martín J., González Gallardo S., Páez Esquiliano D., Martínez Vidal S., Mendoza Pérez L., Cruz Jiménez G. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. **VIII Congreso de Investigación y II de Posgrado en la FES Zaragoza. 22-26 de octubre de 2012.**

35. Bloomfield S.F., Arthur M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramines T.J. Appl. Bacteriol. 1992; 72(2): 166-72.
36. Waites W. M., Bacyliss C. E. The effect of changes in spore coat on the destruction of *bacillus cereus* spores by heat and chemical treatment. J.Appl Biochem. 1979; 1:71-76.
37. Williams N D, Russell A D. The nature and site of biocide-induced sublethal injury in *Bacillus subtilis* spores. FEMS Microbiol Lett. 1992; 99:277–280.
38. Wright A. M, Hoxey E. V, Soper C J, Davies D J G. Biological indicators for low temperature steam and formaldehyde sterilization: effect of variations in recovery conditions on the response of spores of *Bacillus stearothermophilus* NCIMB 8224 to low temperature steam and formaldehyde. J. Appl Microbiol. 1997; 82:552–556.
39. Yasuda-Yasuki Y, Namiki-Kanie S, Hachisaka Y. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. In: Chambliss G, Vary J C, editors. Spores VII. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1978. pp. 113–116.
40. Paulsen I T, Park J H, Choi P S, Saier M H. A family of gram-negative outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1997; 156:1–8.
41. Maillard JY, Russell AD. Viricidal activity and mechanisms of action of biocides. Sci Prog 1997; 80(Pt4):287-315.
42. Durán V. H. C. Soluciones de Superoxidación y Su Evolución Tecnológica. Revista Dolor, Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica. Año 7-Vol.III• 2010. México.
43. Reyes Garcés José Ángel, Tesis; “Efecto inhibitorio de una solución electrolizada de superoxidacion con pH neutro en bacterias”, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Año 2012.
44. 08_Tema_14_limpieza_desinfecc%C3%B3n.pdf.
45. <http://www.fvc.unlp.edu.ar/analecta/vol.25nl/097-Jurado-ME. Pdf>
46. <http://www.ciencia.net/vararticulo/Microscopio-electr%C3%B3nicode-transi%C3%92n.pdf>
47. <http://www.bolivar.udo-ve/biologia/tecnicas.htm>
48. <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro7.htm>
49. [www.esteripharma.com.mx/FichatecnicaeestericideQx_y_ficha_tecnica_de_soluvet.](http://www.esteripharma.com.mx/FichatecnicaeestericideQx_y_ficha_tecnica_de_soluvet.pdf)
50. http://www.esteripharma.com/lineas_veterinaria_soluvet.htm
51. www.amuepey.com.mx/files/ficha_soluvet.pdf
52. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_14_Limpieza_desinfecci%C3%B3n.pdf (11)
53. <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/556/1/TN991.pdf> (evaluación de efecto bactericida)
54. <http://es.scribd.com/doc/31345408/clasificacion-desinfectantes>
55. <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/TODO%20IIH/007%20Desinfectantes.pdf>
56. <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=64688&pagina=2>
57. <http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=11181>
58. <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/09esporas.htm>



59. www.esteripharma.com.mx/feq.php#phar8
60. <http://www.esteripharma-agrovet.com/investigacion.php>
61. Hernandez Zamora Sonia; Efecto sinérgico y/o antagónico de Qitosán y extracto de Calendula officinalis en bacterias asociadas a infecciones de heridas en humanos; Tesis Profesional. Q.F.B. FES-Cuautitlan. UNAM. 2007.