

302
2y



Universidad Nacional Autónoma de México.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE
INDICADORES BIOLÓGICOS
DISPONIBLES EN MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A:

LUZ MARÍA PARRA PÉREZ

Tutor: Dr. Enrique Acosta Gio

Asesores: C.D. Alfredo Aguirre Mejía

C.D. Sergio Sánchez García



Ciudad Universitaria. México, D.F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

265788



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

No existen las palabras suficientes para agradecer a mis padres Teresita y Ricardo, su amor, ejemplo, comprensión y por cuanto han hecho para que yo lograra esta meta; simplemente todo selos debo a ustedes y esta tesis también les pertenece.

A mis abuelos M^a Elena† y J. Trinidad.

Por todas sus bendiciones y consejos que me ayudaron muchas veces a seguir adelante.

A mis amigos que siempre me apoyaron.

Al Dr. Enrique Acosta, por haber dedicado su tiempo y ayuda, para la elaboración de esta tesis.

***ANÁLISIS COMPARATIVO DE
INDICADORES BIOLÓGICOS
DISPONIBLES EN MÉXICO***

ANÁLISIS COMPARATIVO DE INDICADORES BIOLÓGICOS DISPONIBLES EN MÉXICO

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
Ventajas y desventajas de los métodos de esterilización	5
Clasificación de instrumentos contaminados	8
Clasificación de los niveles de desinfección	8
Monitoreo de los ciclos de esterilización	9
Causas de falla en los ciclos de esterilización	10
• Verificación física	11
• Pruebas Físico – Químicas	11
Verificación Biológica	13
• ¿Que son los Indicadores Biológicos?.....	13
• ¿Porqué el uso de esporas?.....	15
• ¿Cuándo se utilizan?	15
• ¿Que es importante de conocer de los IB?.....	16
Características generales del género Bacillus.....	17
• Bacillus subtilis var niger.....	18
• Bacillus stearothermophilus.....	20
Características que deben reunir los Indicadores Biológicos	23
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	26

5.- OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos específicos	27
6.- HIPÓTESIS	28
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	29
Tipo de estudio	29
Población sujeta a estudio	29
Tamaño de la muestra	30
Variables	30
Definición Operativa	30
Criterios de Inclusión	31
Criterios de Eliminación	31
Procedimiento	32
• Cultivo e incubación	32
• Cuantificación de UFC	32
• Identificación Macroscópica y Microscópica	34
• Pruebas bioquímicas	34
• Evaluación de las características del producto	34
8.- RESULTADOS	35
Indicadores Biológicos existentes en México	35
Temperatura de crecimiento	37
Identificación morfológica	37
Cuantificación	43
Pruebas bioquímicas	44
Cumplimiento de las características de envase	44

DISCUSIÓN	46
Anexo N° 1.- Agar Nutritivo.....	51
Anexo N° 2.- Cuantificación de UFC.....	52
Anexo N° 3.- Identificación Morfológica.....	53
Anexo N° 4.-Tinción con azul de algodón.....	54
Anexo N° 5.- Prueba de Catalasa.....	55
Anexo N° 6.- Hemólisis de Agar- Sangre.....	56
Anexo N° 7.- Reacción de Voges -Proskauer.....	57
Anexo N°8.- Crecimiento Anaerobio.....	58
Anexo N° 9.- Hidrólisis de Almidón.....	59
REFERENCIAS	61



1.- RESUMEN

Los ciclos de esterilización son falibles, el uso de los Indicadores Biológicos (IB), proporciona el control de calidad necesario en cada ciclo de esterilización, y es el único método que demuestra que logramos esterilizar el instrumental.

El objetivo de este estudio fué, comparar los IB distribuidos en México, utilizando como grupo control las cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), y con base a las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

Las marcas Merck, Becton and Dickinson, MDT, Belsa y Raven, fueron analizadas en este estudio.

Con la identificación morfológica, verificación de la temperatura de crecimiento, cuantificación de colonias y con pruebas bioquímicas, se pudo comprobar que no todos los IB, cumplen con lo establecido por la FEUM, para poder ser utilizados como verificadores.

Las marcas que contienen, *B. subtilis* (Belsa y Raven), cumplieron con las características morfológicas correspondientes a la ATCC (9372).

Los IB de las marcas que contenían *B. stearothermophilus*, presentaron las mismas características de las colonias de la ATCC (7953), excepto Belsa, que crece mejor en una temperatura de 37°C, además, de presentar las mismas características microscópicas que *B. subtilis*, sin pertenecer a la variedad *niger*.



2.- INTRODUCCIÓN

Existe un interés renovado, sobre las técnicas de asépsia en consultorios médicos y dentales. El desarrollo de nuevos equipos de esterilización y la introducción de sistemas de control de calidad para los mismos, a motivado a los profesionales, a buscar información actualizada sobre las estrategias disponibles para la esterilización del instrumental en sitios de atención a la salud.

La esterilización es la destrucción de todas las formas de vida microbiana, incluyendo: virus, bacterias, hongos y esporas bacterianas altamente resistentes⁽¹⁾.

Desde luego, el uso adecuado de los métodos de esterilización, es importante, para evitar que los instrumentos contaminados lleven infecciones de un paciente a otro (infecciones cruzadas)⁽²⁾.

Para lograr la esterilización del instrumental, contamos con diferentes métodos, tanto físicos como químicos (Tabla 1).

Las técnicas de esterilización, pueden requerir calor (FIG. 1-3) o llevarse acabo a bajas temperaturas⁽³⁾.

1. Calor $\geq 121^{\circ}\text{C}$

- a) Vapor de agua a presión.
- b) Vapor químico a presión.
- c) Calor seco:
 - *convección natural*
 - *flujo forzado.*

2.- Calor $< 80^{\circ}\text{C}$

- a) Óxido de etileno.
- b) Plasma ionizante.

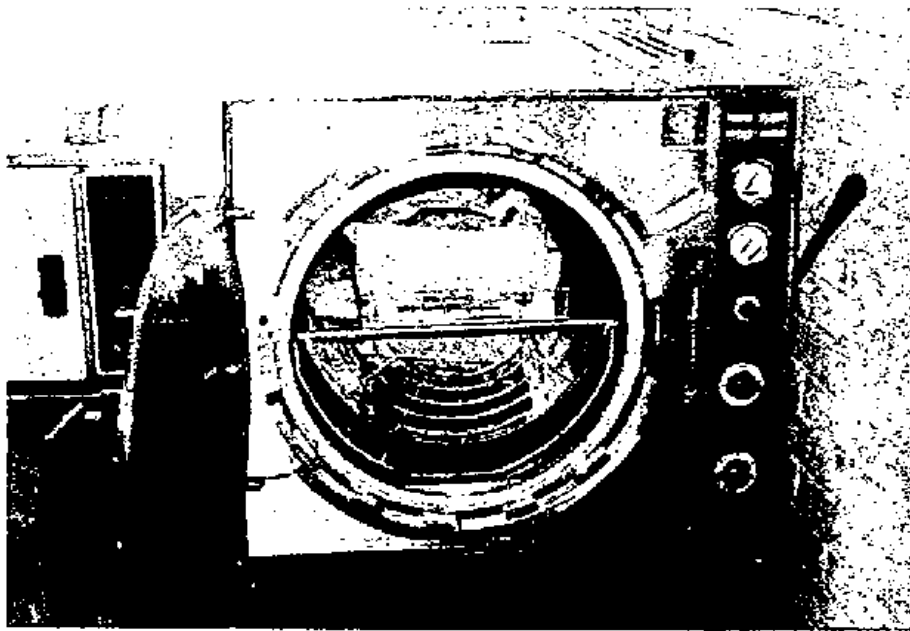


FIG. 1.- Vapor a presión.

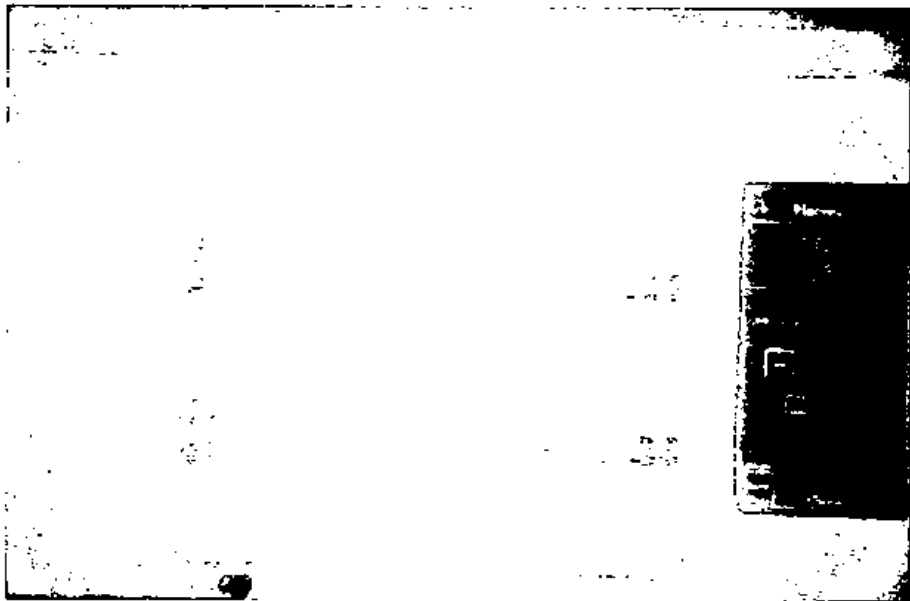


FIG. 2.- Quemiclave™.

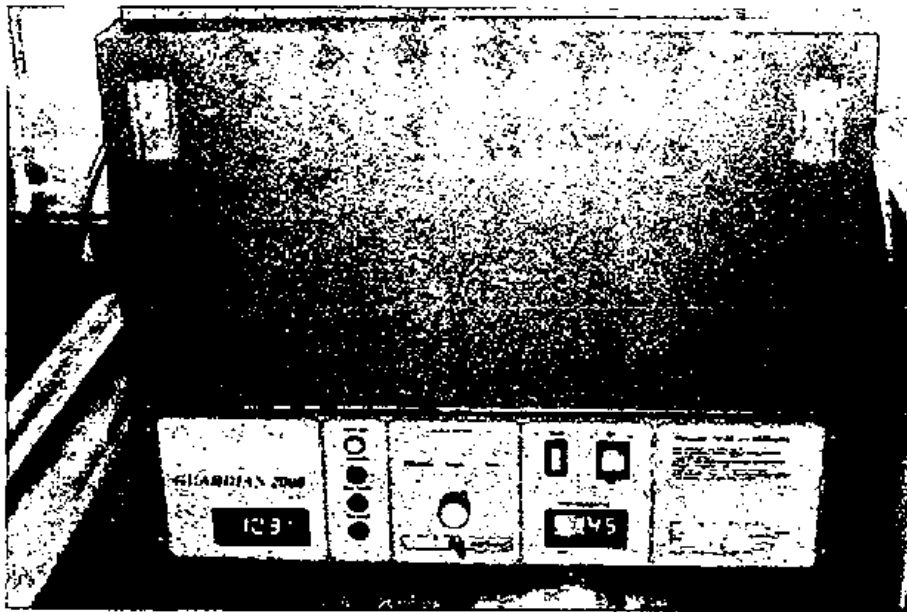


FIG.3.- Horno de calor seco.



Tabla 1.- Ventajas y desventajas de los métodos de esterilización.

Método de esterilización	Condiciones estándar	Ventajas	Desventajas
Vapor de Agua a presión ciclo estándar	20 min. a 121°C. 15 lb de presión.	Buena penetración del calor. Esteriliza líquidos hidrófilicos. Ciclo corto.	No introducir contenedores cerrados herméticamente. Daña los plásticos termolábiles. Puede corroer los metales y dañar los filos.
ciclo rápido	3-5 min. a 134°C. 30 lb de presión.		
Vapor Químico Saturado	20 min. a 132°C. 32 lb de presión.	Buen tiempo de esterilización. No produce corrosión.	No introducir contenedores cerrados herméticamente. Daña los plásticos. Es un método de mayor costo. Requiere de una ventilación adecuada por la producción de vapores tóxicos e irritantes y mal olor. No esteriliza líquidos.
Calor seco			
Convección natural	60-120min. a 170°C.	No produce corrosión. No daña los filos.	Ciclo largo. No esteriliza líquidos.
Flujo forzado	15min. a 200°C para instrumental envuelto 8min. a 200°C sin envolver	Ciclo corto.	Se pueda contaminar el material rápidamente.

Continúa....



Método de esterilización	Condiciones estándar	Ventajas	Desventajas
Plasma ionizante	60 min. a 40°C	Esteriliza plásticos. No genera subproductos tóxicos. No necesita ventilación.	Costo elevado. Solo existen modelos para hospitales. No puede esterilizar papel, celulosa, algodón ni líquidos.
Oxido de Etileno	8-10 horas a 20°C	Se puede esterilizar cualquier material sólido.	Ciclo muy largo. Requiere una ventilación adecuada.



La principal ventaja de la esterilización, sobre la utilización de desinfectantes, es que los métodos de esterilización, pueden ser monitoreados biológicamente durante su uso, por lo que poseen un mayor rango de seguridad ⁽⁴⁾.

Sin embargo, debido a la composición de algunos instrumentos, se recurre a los desinfectantes con alto nivel germicida. Desafortunadamente, algunos Profesionales de la Salud confunden desinfección con esterilización.

Spaulding en 1972 ^(4,5), dividió a los instrumentos según su uso, para distinguir cuales deben de esterilizarse y cuales solo se pueden desinfectar. Esta clasificación, en críticos, semicríticos y no críticos, se muestra en la tabla 2. También dividió a los desinfectantes de acuerdo a su poder germicida, en niveles: alto, medio y bajo (Tabla 3).

Los instrumentos que son desinfectados no quedan estériles, y la destrucción microbiana que ocurre en este proceso no puede ser verificada, por lo que la utilización de desinfectantes se debe limitar exclusivamente a los instrumentos semicríticos que son dañados por los métodos de esterilización mediante calor.



Tabla 2.- Clasificación de instrumentos contaminados según Spaulding ^(4,6).

Instrumentos	Descripción	Ejemplos
Criticos	Son aquellos que penetran a los tejidos y a sitios normalmente estériles.	Instrumentos utilizados en cirugía.
Semicriticos	Los instrumentos que solo tienen contacto con las mucosas.	Cucharillas de impresión, espejos dentales.
No Criticos	Aquellos que solo tocan la piel, equipo que normalmente no penetra o hace contacto con las mucosas.	Aparato de rayos X, lámpara para resinas.

Tabla 3. Clasificación de los niveles de desinfección (Spaulding ^(4,6)).

Nivel	Descripción	Ejemplo
Alto	Son productos capaces de destruir algunas endoesporas bacterianas, llevan en su etiqueta el termino de espicidas, y también son antituberculosos.	Glutaraldehido
Intermedio	Productos que eliminan a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , al virus de la Hepatitis B (VHB) y al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), pero no es capaz de destruir esporas.	Fenoles (fenol, cresol, gluconato de clorhexidina) Halógenos (hipoclorito de Na, yodo)
Bajo	Productos que destruyen a la mayoría de las bacterias en vida vegetativa algunos hongos y virus. No destruye endoesporas ni a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Compuestos del amonio cuaternario



Monitoreo de los ciclos de esterilización.

Los métodos de esterilización, no son una garantía de esterilidad ya que son falibles⁽⁵⁾, si no se toman en cuenta diferentes factores como:

- La limpieza del instrumental.
- Empaquetado.
- Distribución de la carga.
- Operación del equipo.
- Funcionamiento del aparato.
- Entrenamiento frecuente del personal a cargo.

Las causas más comunes por las que puede fallar un ciclo de esterilización ⁽¹⁾ se presentan en la tabla 4.

Para vigilar el apropiado funcionamiento de los equipos de esterilización, se emplean la verificación física, las pruebas fisico-químicas, y las pruebas biológicas; estas últimas, son el único método, para verificar los ciclos de esterilización ⁽⁷⁾.



Tabla 4.- Causas más comunes por las que falla un ciclo de esterilización.

Inadecuada penetración del agente esterilizante a la cámara de esterilizado. <ul style="list-style-type: none">• Sobrecarga.• Mala separación entre cada paquete de instrumentos.
Mal empaquetamiento <ul style="list-style-type: none">• Uso de contenedores sólidos cerrados herméticamente en los métodos de vapor de agua o químico a presión.• Instrumental mojado.• Envoltura inadecuada al método de esterilización.• Utilizar más de dos envolturas en el instrumental a esterilizar.
Tiempo inadecuado <ul style="list-style-type: none">• Incorrecto uso del esterilizador.• Empezar a tomar el tiempo de esterilizado a partir de que se enciende el aparato.• Abrir la puerta de un esterilizador de calor seco una vez iniciado el ciclo.• Mal funcionamiento del contador del tiempo.• Falla en el suministro eléctrico.
Temperatura inadecuada <ul style="list-style-type: none">• Incorrecto uso del esterilizador.• Mal funcionamiento del aparato de esterilizado.• Falta de mantenimiento.
Mal lavado del instrumental por procesar <ul style="list-style-type: none">• La presencia de restos orgánicos, impiden la esterilización con vapor de agua, químico o calor seco.



Verificación Física.

Comprende la observación sistemática de los cronómetros, termómetros y manómetros de los aparatos de esterilización⁽⁸⁾.

Pruebas Físico-Químicas.

La supervisión físico-química de los esterilizadores, comprende la utilización de indicadores por cambio cromático.

Las cintas, etiquetas y marcas para bolsas se conocen como indicadores físico-químicos externos que cambian de color luego de la exposición breve a una temperatura elevada. Su finalidad, es tan sólo, diferenciar los artículos procesados, a través de un esterilizador de los que aún no lo están y no son una prueba de esterilidad⁽⁸⁾.

Otro tipo de pruebas, son los diseñados para usarse en el interior de los paquetes o las bolsas, llamados integradores de proceso⁽⁹⁾. Estos comprueban que el proceso de esterilización se mantuvo a una temperatura elevada, por un cierto tiempo de exposición (FIG.4).

Este tipo de integradores, deberán ser acompañados de un indicador químico externo para la identificación de los paquetes.

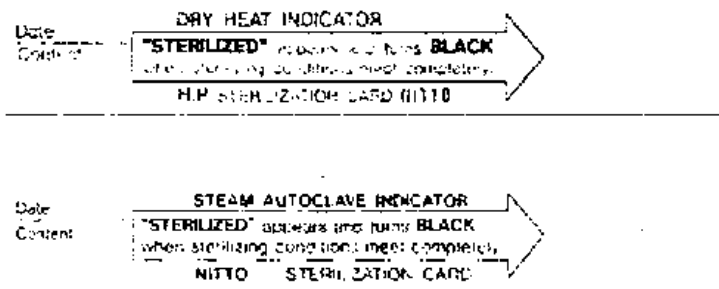


FIG.4.- Integradores de Proceso.



Verificación biológica.

Comprende el empleo de pruebas con esporas bacterianas⁽¹⁰⁾, denominadas Indicadores Biológicos (IB).

La Asociación Dental Americana (ADA)⁽³⁾, la Fundación para la Investigación de Procedimientos de Seguridad y Asépsia (OSAP, por sus siglas en inglés)⁽⁶⁾, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés)⁽⁵⁾, la Asociación para el Avance en la Instrumentación Médica (AAMI, por sus siglas en inglés)^(11,12), y la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994⁽¹³⁾, recomiendan el uso de IB para verificar el éxito de los ciclos de esterilización.

¿Que son los Indicadores Biológicos?

Los IB, aplicables en el consultorio dental, son preparaciones con esporas bacterianas del género *Bacillus*, que se encuentran en una forma no germinativa, de la cual salen cuando se les proporcionan los nutrientes necesarios y son incubadas a una temperatura apropiada, dependiendo de la especie que contenga (*B. subtilis* a 37°C ó *B. stearothermophilus* a 57°C)⁽¹⁴⁾. Estas se encuentran contenidas en una tira o disco de papel filtro o en una ampollita que contiene caldo nutritivo (FIG.5).

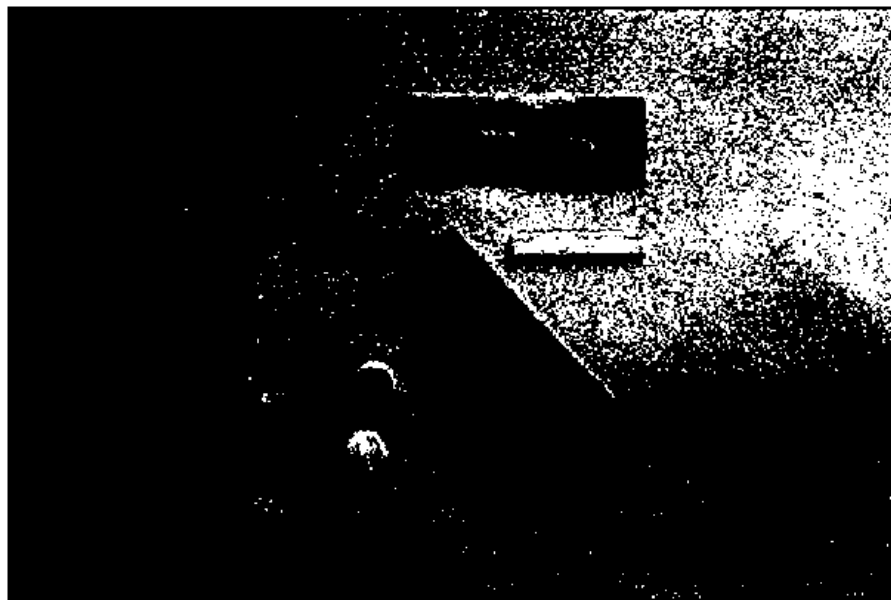


FIG.5.- Pruebas Biológicas.



¿Porqué el uso de esporas?

Se utilizan estas esporas por no ser patógenas al ser humano y por su resistencia conocida a los procesos de esterilización; siendo su destrucción la única garantía de una esterilización exitosa⁽¹⁵⁾.

Para los procesos de esterilización por calor seco y óxido de etileno, se aplican esporas de la especie *B. subtilis* variedad *niger*, y para los procesos de esterilización por vapor se emplean esporas de la especie *B. stearothermophilus*. Las esporas de cepas de *B. pumillus*, han sido utilizadas para verificar los procesos de esterilización por radiaciones ionizantes⁽¹⁴⁾.

¿Cuándo se utilizan?

El uso de los IB, se encuentra en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) ⁽¹⁴⁾ y en la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP por sus siglas en inglés)⁽¹⁶⁾ las cuales indican su utilización en los siguientes casos:

- Se utilizan como auxiliares en la calificación física de aparatos de esterilización.
- En el desarrollo y establecimiento de un proceso de esterilización, validado para un producto.
- En la verificación periódica de esterilización de equipo, materiales y componentes de empaque, que se emplean en procedimientos asépticos y
- En programas de verificación periódica de ciclos de esterilización.



¿Que es importante conocer de los IB?

Las esporas bacterianas utilizadas como IB, deben de cumplir con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas de las cepas correspondientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés)⁽¹⁷⁾, que se encuentran establecidas en la FEUM ⁽¹⁴⁾, y USP⁽¹⁶⁾, junto con las especificaciones que todo IB deben de reunir.

Son varias las compañías que fabrican y/o distribuyen IB en México como: Becton and Dickinson, Belsa, Especialistas en Esterilización y Envase, Merck, MDT y Raven. Los cuales deben de respetar la especie y las características que deben de reunir los IB; de lo contrario, los usuarios podrían resultar afectados al no recibir, el producto que requieren.

Los aspectos importantes que deben conocer los usuarios son:

- El correcto manejo y uso de los IB.
- Las diferentes marcas comerciales que se encuentran disponibles en México y
- La calidad de cada una de ellas.



Características generales del género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus*, son bacilos Gram positivos que se agrupan formando cadenas, endoesporas y son aerobios o anaerobios facultativos. La mayoría de los miembros del género son organismos saprófitos como: *B. cereus* y *B. subtilis* que permanecen en el suelo, aire y vegetales ⁽¹⁸⁾.

Las bacterias tienen forma de varilla (bacilares), y en su mayoría son móviles por medio de flagelos laterales. La formación de un sólo endoesporo en la bacteria vegetativa es un aspecto dominante del género ⁽¹⁹⁾.

Los esporos pueden ser ovalados o esféricos y pueden tener ubicación central, subterminal o terminal. La presencia del esporo hace que la célula se hinche en algunas especies como *B. stearothermophilus* ⁽²⁰⁾.

Las endoesporas, no tienen metabolismo detectable, son muy resistentes a los cambios de ambiente y pueden sobrevivir durante décadas en estado latente. Resisten la acción de algunos agentes químicos, enzimas, calor, radiación ionizante y luz ultravioleta. Los alcoholes, fenoles, iones metálicos pesados y detergentes no sirven para destruir endoesporas ^(21,22).

Las diferentes especies tienen límites muy amplios de morfología. Las colonias aisladas pueden variar de acuerdo a la composición del medio ⁽¹⁸⁾.

Varias especies producen pigmentos que pueden colorear las colonias de amarillo, rosado, rojo y hasta negro, tales pigmentos son: la pulquerimina y el ácido protocatético ^(21,22).



Bacillus subtilis var niger.

Este bacilo es empleado en la preparación de IB, utilizado para verificar los ciclos por calor seco y oxido de etileno, en el catálogo de la ATCC⁽¹⁷⁾ corresponde a la cepa número 9372, y sus características se encuentran en la FEUM y USP^(14,16).

Es un bacilo Gram positivo de 0.7 a 0.8 micras de anchura por 2 a 3 micras de longitud, con endoesporas ovales y centrales que no deforman a la célula.

Cuando se cultiva a 37°C, en un ambiente aerobio ó anaerobio, en un medio nutritivo, el crecimiento se presenta en 24 horas, incubado a 57°C no muestra evidencia de crecimiento (Fig. 6).

En agar las colonias tienen apariencia opaca y pueden ser de color crema o ligeramente cafés, cuando se incuba en caldo nutritivo se forma una película en la superficie y puede presentar turbidez ligera o no presentarla ⁽²²⁾.

Algunas de sus reacciones bioquímicas (Diagrama 1) son: formar un pigmento negro a partir de la tirosina, licuar la gelatina, utilizar e hidrolizar tanto el almidón como a la glucosa sin producir gas y muestran una reacción positiva a la prueba de catalasa, y a la reacción de Vogues-Proskauer^(22,23).

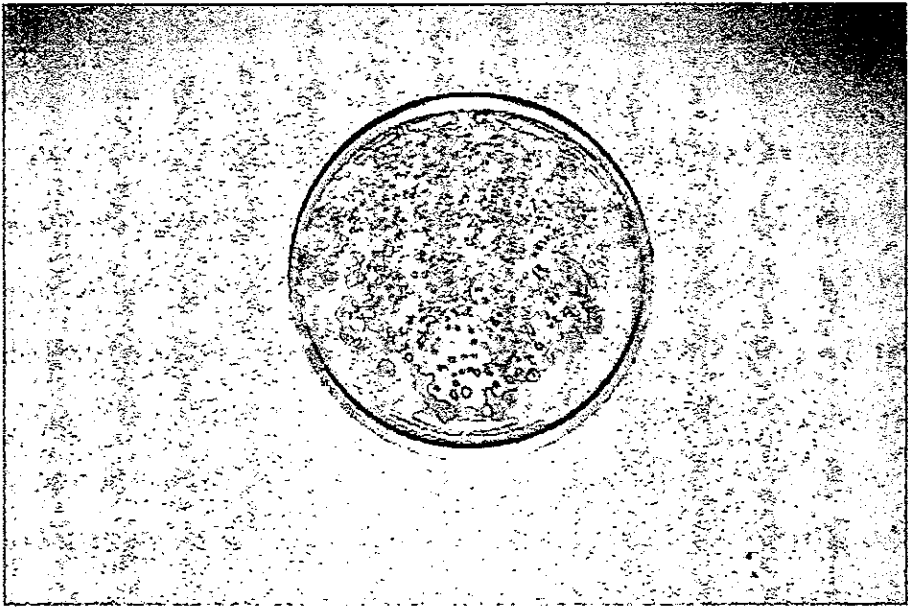


FIG.6.- Bacillus subtilis variedad niger, correspondiente a la ATCC (9372).



Bacillus stearothermophilus.

Los IB que contienen este bacilo, correspondiente a la cepa de la ATCC 7953⁽¹⁷⁾, son utilizados para verificar los ciclos de esterilización por vapor.

Al microscopio se observan como bacilos Gram positivos, con endoesporas ovales, subterminales que deforman a la célula ⁽¹⁸⁾.

Cuando se transfiere un inóculo del crecimiento obtenido en caldo nutritivo, a medios sólidos apropiados (agar nutritivo), se presenta crecimiento en incubación aeróbica y anaeróbica en 24 horas a 57°C (FIG.7), y no presenta crecimiento a 37°C^(22,23).

Estos IB reaccionan a diferentes pruebas bioquímicas (Diagrama 1): reaccionan positivamente a la prueba de catalasa; no licúa la gelatina y es negativo a la prueba de Vogues - Proskauer ^(22,23).

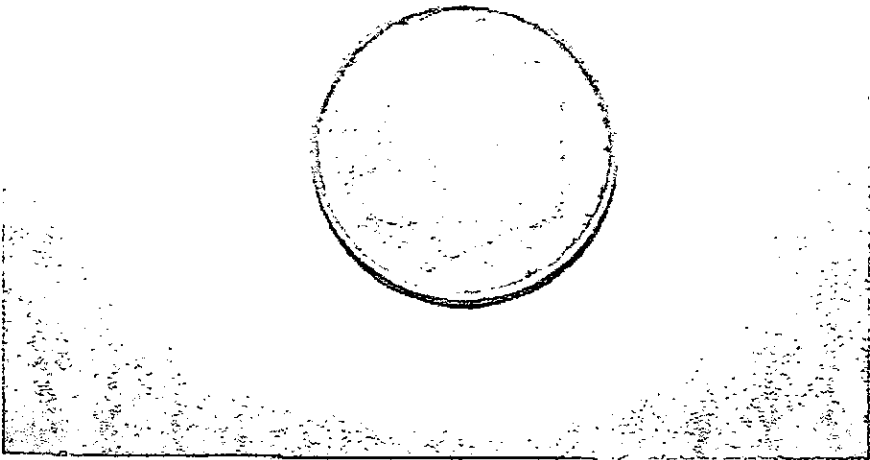
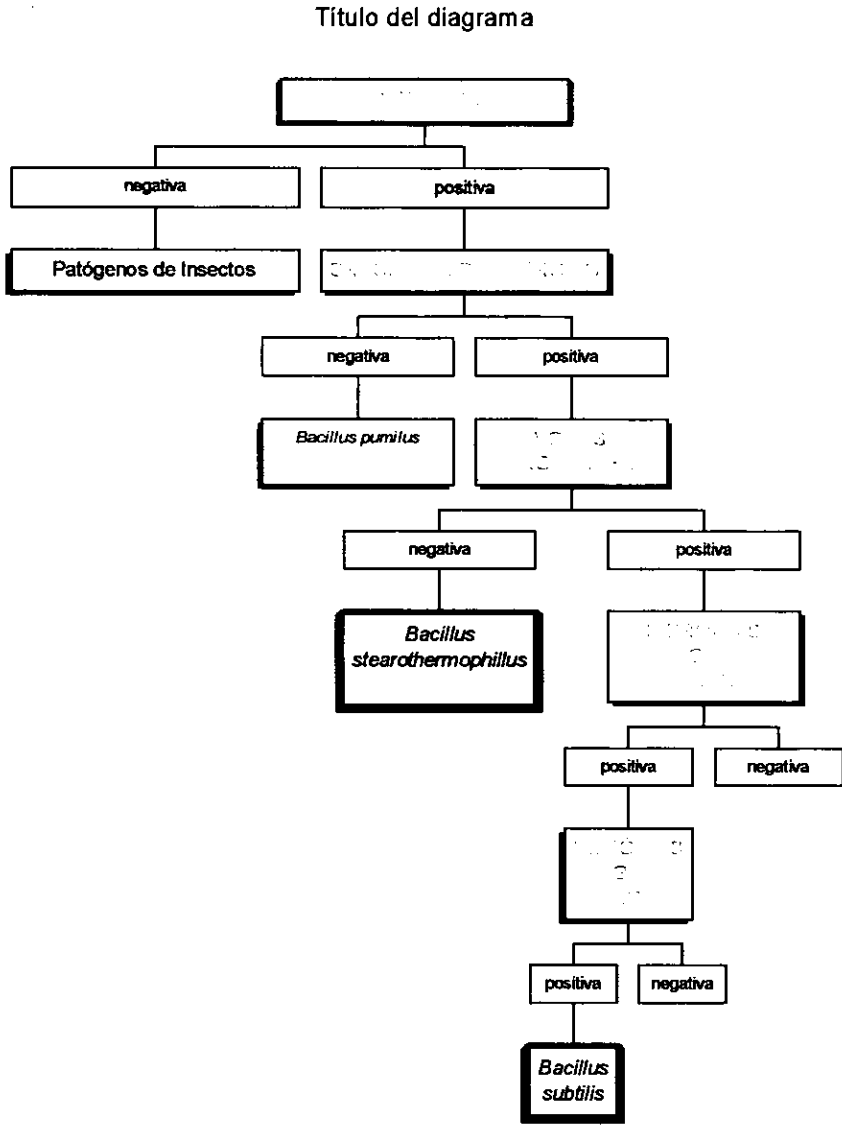


FIG.7.- Bacillus stearothermophilus, correspondiente a la ATCC (7953).

Diagrama 1.- Reacciones bioquímicas para la identificación de especies.





Características que deben de reunir los IB.

Todos los IB para utilizarse y conservarse correctamente tiene que tener ciertas características, las cuales deben incluirse en el empaque y/o en una etiqueta, así como anexar un instructivo, como se especifica en la FEUM⁽¹⁴⁾ y en la USP⁽¹⁶⁾. Los principales datos que deben contener son los siguientes:

1. Especificar que especie(s) contienen los IB, esto con el fin de orientar al usuario sobre el tipo de esterilización al cual podrá ser sometido.
2. Origen y la cepa de donde fueron obtenidas las esporas utilizadas.
3. Indicar en que presentación se encuentran las endoesporas bacterianas, las cuales podrán ser dos tipos:
 - a) En tiras o discos de papel filtro las cuales tienen un número específico de esporas en estado vegetativo; estos discos o tiras a su vez están contenidos en una bolsa que aísla los microorganismos del medio ambiente, una vez procesado este tipo de IB deberán ser sembrados en un medio líquido. Por lo general en esta presentación se incluyen las dos especies de microorganismos utilizados como IB.
 - b) En ampollitas, las cuales contienen a los microorganismos suspendidos en un medio líquido, con un colorante específico, una vez procesados este tipo de IB, sólo será necesario incubarlos. Este tipo de IB generalmente sirve para verificar ciclos de esterilización a presión.
4. Indicar el grado de exposición a la esterilización (valor D), que es el tiempo requerido, para destruir el 90% de los microorganismos.
5. Tiempos de sobrevivencia (en el cual aún existen esporas viables) y tiempo de muerte (en el cual la posibilidad de sobrevivencia de esporas es mínima).



-
6. Cuenta viable de esporas, la cual puede ser determinado a través de una cuenta real, los IB no deben contener un número menor de esporas viables que la indicado en la etiqueta, ni mas del 300% de dicho valor.
 7. Las dimensiones de las tiras de papel y la cantidad de medio, según sea la presentación.
 8. Instrucciones para la recuperación de esporas y su destrucción segura antes de ser desechadas.
 9. Fecha de caducidad que no debe ser menor de 24 meses a partir de la fecha de fabricación, la cual se inicia cuando fue realizada la primera cuenta viable total.
 10. Recomendaciones sobre los cuidados de su empaque y el modo de conservación.



3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con la obligatoriedad de utilizar Indicadores Biológicos para verificar los ciclos de esterilización, se ha dado lugar a que surjan en el mercado diversas compañías que los fabrican y/o distribuyen.

Es muy importante establecer que las marcas de IB que existen en el mercado nacional cumplan con las características de la ATCC ⁽¹⁷⁾ y con las especificaciones de la FEUM ⁽¹⁴⁾.

Por lo que la pregunta de investigación es:

¿Las pruebas de Indicadores Biológicos que se fabrican y/o distribuyen en México cumplen con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas, correspondientes a las cepas de la ATCC y con las especificaciones de la FEUM?.



4.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Este estudio brindará una mayor información sobre los tipos de IB que existen en México, así como la evaluación de los mismos. Esta información podrá ser utilizada por toda la comunidad odontológica, para realizar una mejor elección de los IB.

Así mismo, con los resultados obtenidos se podrá determinar si los IB de las compañías distribuidoras cumplen con las especificaciones y características establecidas en la FEUM⁽¹⁴⁾.



5.- OBJETIVO GENERAL.

Comparar diferentes Indicadores Biológicos que se distribuyen en México, utilizando como grupo control las cepas tipo de la ATCC ⁽¹⁷⁾ y las especificaciones contenidas en la FEUM ⁽¹⁴⁾.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar el número de compañías distribuidoras de IB en México.
2. Establecer si todas las compañías brindan las indicaciones mínimas necesarias en cuanto a la utilización, manejo y cuidados de los IB.
3. Realizar cultivos de cada unos de los IB disponibles en México, para:
 - a) Identificar macroscópicamente y microscópicamente *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*, y comprobar la pureza del producto.
 - b) Realizar conteos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en cada cultivo, para comprobar la veracidad de las indicaciones de cada fabricante.
 - c) Realizar pruebas bioquímicas de identificación para comprobar que los especies utilizadas cumplan con las características de las cepas tipo según las especificaciones de la FEUM.
- 4.- Determinar las ventajas y desventajas que ofrece cada una de las pruebas evaluadas.



7.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Tipo de estudio.

Este es un estudio observacional analítico.

Población sujeta a estudio.

Grupo de Prueba:

1. Indicadores Biológicos de la marca Merck (*B. stearothermophilus*).
2. Indicadores Biológicos de la marca Becton and Dickinson
(*B. stearothermophilus*).
3. a) Indicadores Biológicos de la marca Belsa
(*B. stearothermophilus*).
b) Indicadores Biológicos de la marca Belsa
(*B. subtilis var niger*).
4. a) Indicadores Biológicos de la marca Raven
(*B. stearothermophilus*)
b) Indicadores Biológicos de la marca Raven
(*B. subtilis var niger*).
5. Indicadores Biológicos de la marca MDT (*B. stearothermophilus*).

Grupo Control:

Cepas tipo de *Bacillus subtilis var niger* de la ATCC (No.9372).

Cepas tipo de *Bacillus stearothermophilus* de la ATCC (No.7953).



Tamaño de la muestra.

Se utilizaron los IB de cinco marcas distintas, a cada una de las muestras, se les realizaron pruebas de identificación por triplicado, con el fin de confirmar la especie contenida en cada producto.

Variables.

Los cultivos de los IB: Merck, Becton and Dickinson, Belsa, Raven, MDT, cepas tipo de la ATCC (9372 y 7953); la temperatura de Incubación; la cuantificación de UFC de cada muestra por evaluar; las pruebas de identificación morfológica macroscópica y microscópica por medio de tinciones de Gram y con azul de algodón, las pruebas de identificación bioquímica (Prueba de la catalasa, Hemólisis de agar sangre, Reacción de Voges Proskauer, Hidrólisis de almidón y Crecimiento anaerobio).

Definición Operativa.

Cada cultivo fue realizado bajo las mismas condiciones, con los mismos medios y las mismas diluciones, para cada una de las pruebas evaluadas.

La incubación de cada prueba se realizó siguiendo los tiempos y temperaturas especificadas en la FEUM.

El conteo de las UFC se realizó bajo las mismas condiciones y con los mismos instrumentos.

Las pruebas morfológicas se realizaron con las mismas tinciones para todas las pruebas.

A los cultivos de cada IB, se les realizaron las pruebas bioquímicas de identificación, con los mismos medios de cultivo, complementos y reactivos.



Criterios de Inclusión.

1. Las pruebas de IB disponibles comercialmente en México.
2. Las pruebas evaluadas no deberían estar vencidas.

Criterios de Eliminación.

1. Los cultivos que al ser manipulados se contaminaron.
2. Los cultivos que fueron manipulados incorrectamente.



Procedimiento.

Cultivo e incubación.

A cada una de las muestras de los IB se les realizaron cultivos por triplicado; fueron incubadas en el caso de *B. subtilis* var *niger* a una temperatura de 37°C, y en el caso de *B. stearothermophilus* a una temperatura de 57°C, todas por un periodo de 24 horas, utilizando como medio agar nutritivo (anexo 1), como lo indica el catálogo de la ATCC⁽¹⁷⁾.

Se utilizaron para cada muestra diferentes temperaturas de incubación: 37°C y 57°C; debido a que un fabricante sugiere la incubación a temperatura ambiente, también se realizó a 20°C.

Cuantificación de UFC.

De acuerdo a la FEUM⁽¹⁴⁾, cada uno de los IB, debe contener un número determinado de esporas viables, que puede oscilar entre 5×10^4 hasta 5×10^9 , dependiendo del número de esporas que contenga, le corresponde un tiempo mínimo de sobrevivencia y un tiempo máximo de muerte (Tabla 5).

La cantidad de esporas que contienen los IB de las distintas compañías, se debe de encontrar especificado en la etiqueta del producto al igual que el grado de exposición a la esterilización (valor D).

Se estableció la población aproximada de esporas existentes en cada una de las muestras evaluadas y se confirmaron los tiempos mínimos de sobrevivencia y máximo de muerte señalados por el fabricante, cuando estos estaban presentes.

El método para obtener el número de esporas contenidas en cada IB se encuentra detallado en el anexo 2.



Tabla 5.- Tiempos de sobrevivencia y muerte correspondiente a concentraciones específicas de esporas.

Concentración de esporas (contenido / tira)	Tiempo de sobrevivencia (min.) no menor de:	Tiempo de muerte (min.) no mayor de:
10^4 a menos de 5×10^4	D	8D
5×10^4 a menos de 5×10^5	2D	9D
5×10^5 a menos de 5×10^6	3D	10D
5×10^6 a menos de 5×10^7	4D	11D
5×10^7 a menos de 5×10^8	5D	12D
5×10^8 a 5×10^9	6D	13D



Identificación Macroscópica y Microscópica.

Se observó cuidadosamente la morfología presentada por las cepas obtenidas de todas las muestras estudiadas, comparándose sus características, con la morfología presentada por las cepas de la ATCC.

Se realizaron frotis de las mismas muestras para la identificación microscópica utilizando tinción de Gram y de azul de algodón (Anexo 3,4).

Pruebas bioquímicas.

En base a las reacciones bioquímicas, que tienen lugar en cada especie de *Bacillus*, se realizaron cinco pruebas bioquímicas de identificación, las cuales fueron: Prueba de Catalasa, Hemólisis de agar sangre, Reacción de Voges-Proskauer, Crecimiento Anaerobio e Hidrólisis de agar almidón (Anexos 5-9).

Cada prueba bioquímica se realizó por triplicado, para tener un mayor rango de seguridad.

Evaluación de las características de cada producto.

Para determinar el cumplimiento de las características mínimas de envase que deben de reunir los IB de acuerdo a la FEUM, se revisó detenidamente el empaque y el instructivo anexo, anotando en un cuadro tabular si cumplía o no con las características.



8.- RESULTADOS.

IB disponibles en México.

Existen por lo menos seis compañías que distribuyen y/o fabrican Indicadores Biológicos en México.

Para la realización de este estudio, se utilizaron los IB de cinco compañías (FIG. 8), la marca, presentación y tipo de endospora que contienen se muestran a continuación:

- A) Merck, presentación en ampolletas con *B. stearothermophilus*.
- B) Becton and Dickinson, en ampolletas con *B. stearothermophilus*.
- C) Belsa, en discos de papel con *B. subtilis*.
- D) Belsa, presentación en discos de papel con *B. stearothermophilus*.
- E) Raven, presentación en tiras de papel con ambos tipos de endoespora, (E = *B. subtilis*, F= *B. stearothermophilus*).
- G) MDT, presentación en tiras de papel con *B. stearothermophilus*.

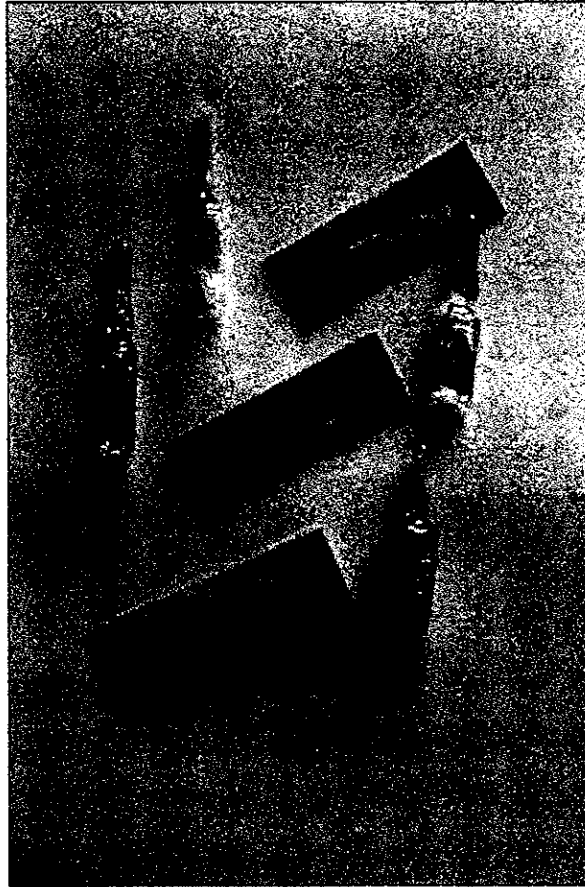


FIG. 8.- Muestra de algunos de los IB disponibles en México



Temperatura de crecimiento comparada con ATCC.

Las marcas C, E, y los cultivos de la ATCC que contienen *B. subtilis*, presentaron un crecimiento masivo a 37°C, y no presentaron desarrollo a 57°C.

Las endoesporas de la ATCC, y las marcas A, B, F y G, los cuales contienen *B. stearothermophilus*, presentaron crecimiento masivo a 57°C y a 37°C en menor cantidad. En la marca D, su mejor desarrollo fue a 37°C y no hubo crecimiento a 57°C.

Identificación morfológica.

Las colonias de la ATCC que contienen *B. subtilis*, macroscópicamente son: de bordes irregulares, de superficie lisa con pigmentación negra (FIG.9). Al microscopio son bacilos circulares con espora de ubicación central y son gram positivos.

Las marcas C y E cumplieron con las características antes señaladas.

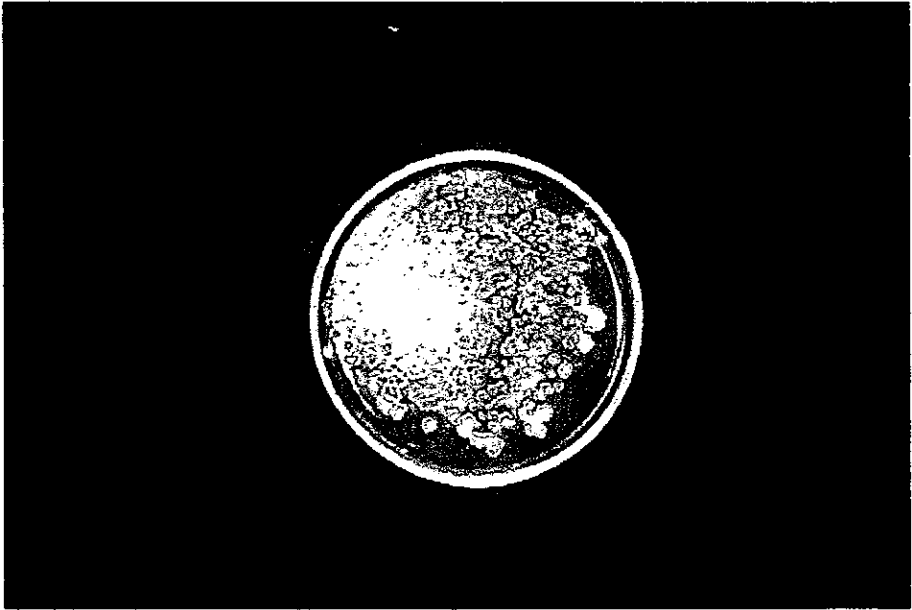
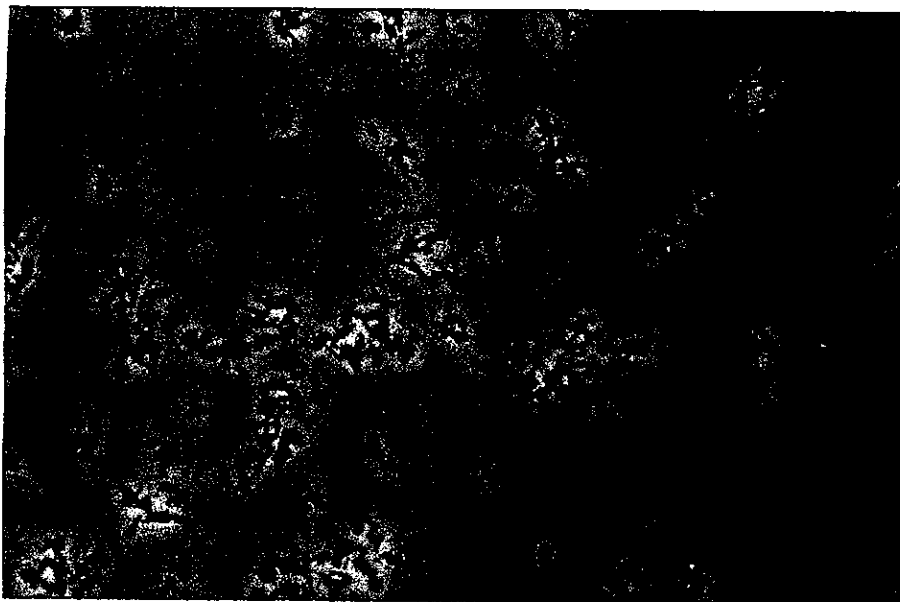
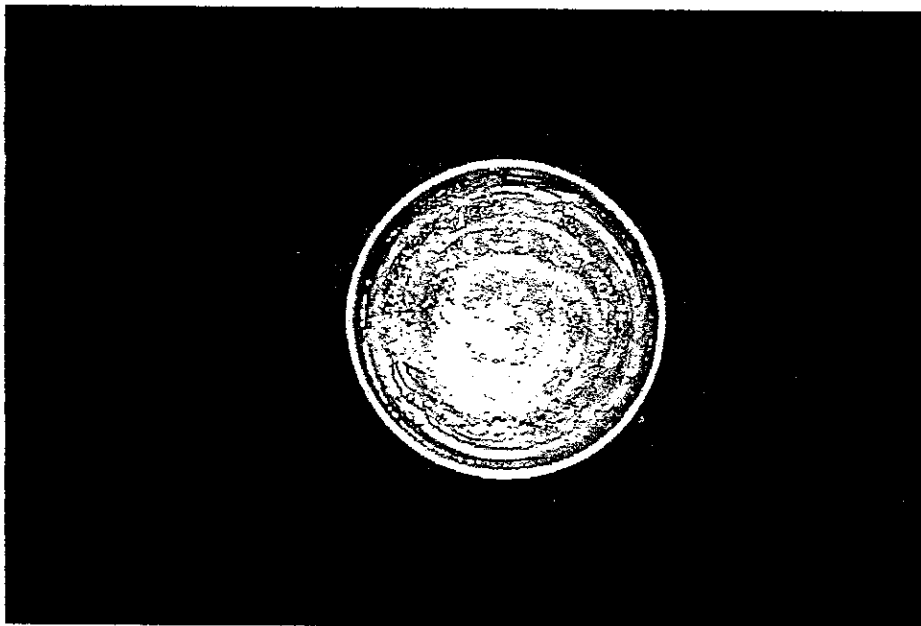


FIG. 9.- Arriba. Identificación morfológica de B. subtilis var niger. Abajo. (fotografía al microscopio con objetivo de inmersión a 1000X)



En la cepa de ATCC correspondiente a *B. stearothermophilus*, se observaron colonias circulares, con bordes bien definidos, de color crema y de superficie lisa, los bacilos son ovals con espora de ubicación subterminal y son Gram positivos (FIG.10). Estas mismas características las presentaron los IB de las marcas A, B, F y G.



*FIG.10.- Arriba. Identificación morfológica de B. stearothermophilus.
Abajo. Fotografía con objetivo de inmersión a 1000X.*



La marca D, que debería contener *B. stearothermophilus* como lo indica el fabricante, no cumplió con las características anteriores, presentando colonias de bordes irregulares, de coloración blanca, con una apariencia opaca y sus características ~~microscópicas son~~ iguales a las de *B. subtilis*, sin pertenecer a la variedad *niger* como la demostró su falta de pigmentación negra (FIG. 11).

Con la identificación morfológica se pudo comprobar que las muestras de IB se encuentran libres de contaminación.

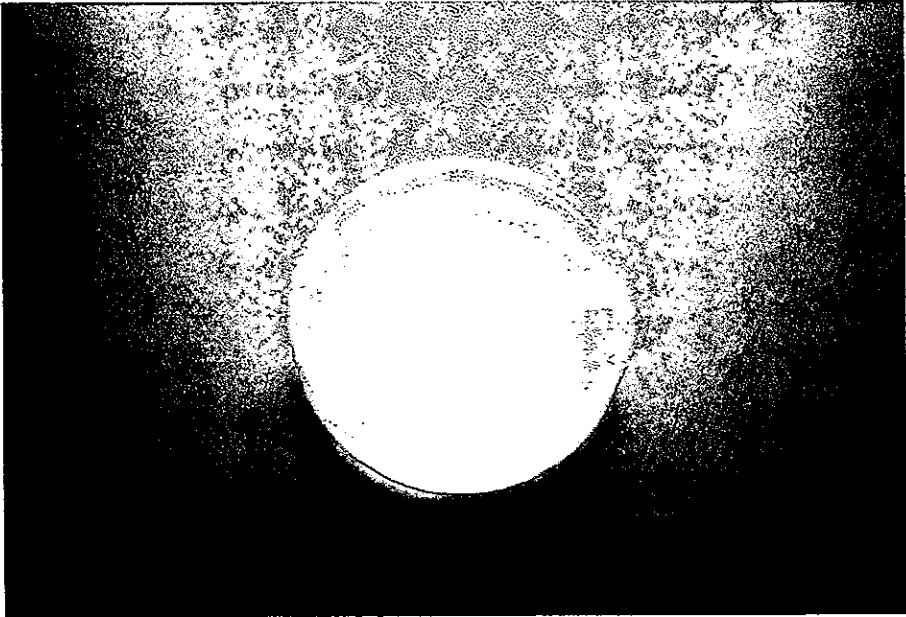


FIG.11.- Identificación morfológica de B. stearothermophilus de la marca Belsa.



Cuantificación de UFC.

La cantidad aproximada de esporas que contiene cada uno de los IB analizados se encuentra registrada en la tabla 6.

Con base a los resultados obtenidos y tomando como referencia la tabla de la FEUM, para la determinación de los tiempos de sobrevivencia y muerte, se comprobó que el tiempo de esterilización recomendado por cada fabricante, es el correcto para cada una de las marcas.

Tabla N° 6.-Comparación de cantidad de esporas contenidas en cada uno de los IB evaluados

MARCA	Cantidad de Esporas (Especificado por el Fabricante)	Cantidad de Esporas (Obtenidas en el estudio, en promedio)
A	De 500,000 a 10,000,000	7,000,000 DE (\pm 1,700,000)
B	1,000,000	800,000 DE (\pm 200,000)
C	De 500,000 a 5000,000	3,000,000 DE (\pm 860,000)
D	De 500,000 a 5000,000	3,800,000 DE (\pm 900,000)
E	1,000,000	1,800,000 DE (\pm 470,000)
F	100,000	150,000 DE (\pm 50,000)
G	500,000	500,000 DE (\pm 460,000)

DE.- Desviación estándar



Pruebas Bioquímicas.

Los cultivos de *B. subtilis* correspondientes a la ATCC, presentaron una reacción positiva a la prueba de la catalasa, a la reacción de Voges-Proskauer, al crecimiento anaerobio, a la hemólisis de agar sangre y a la hidrólisis de agar almidón.

Las marcas C y E, cumplieron con los resultados anteriores.

Los IB que contienen *B. stearothermophilus*, marcas A, B, F y G, al igual que las colonias de la ATCC, fueron positivas a la reacción de la catalasa y al crecimiento anaerobio, y presentaron una reacción negativa a la prueba de Voges -Proskauer; mientras que la marca D, fue positiva a la reacción de Voges- Proskauer.

Cumplimiento de las características de envase.

Una vez confirmada la especie en cada muestra de IB, se revisó que las diferentes marcas cumplieran con las características de envase que señala la FEUM, lo que proporciona los datos necesarios para un mejor manejo, uso y conservación de los IB.

Se encontró que las marcas C y D, no cumplen con tres de los requerimientos y la marca G, no cumple con una de ellas.

En la tabla 7, se muestra el resultado de todas las marcas en cuanto al cumplimiento de las características de envase.



Tabla 7.- Características que deben reunir los IB.

Características que deben cumplir	Muestras Evaluadas					
	A	B	C	D	E	G
Especie especificada	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Presentación	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Valor D	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Tiempos de sobrevivencia y muerte	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Cantidad de esporas	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Origen de la cepa	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Dimensiones del la tira o disco de papel	*	*	no	no	sí	no
Cantidad de medio	sí	sí	*	*	*	*
Indicaciones para recuperación y destrucción total	sí	sí	no	no	sí	sí
Fecha de caducidad	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Cuidados de empaque y conservación	sí	sí	no	no	sí	sí

A. Merck ,con *B. stearothermophilus*.

B. Becton & Dickinson con *B. stearothermophilus*.

C. Belsa, con *B. subtilis*.

D. Belsa ,con *B. stearothermophilus*.

E. Raven, con ambos tipos de esporas.

(E= *B. subtilis*. F= *B.stearothermophilus*)

G. MDT, con *B. stearothermophilus*

*Características que no debe cumplir este IB.



DISCUSIÓN.

El éxito de un ciclo de esterilización, es el resultado de una serie de acontecimientos realizados sistemáticamente que van desde el lavado correcto del instrumental, hasta la esterilización del mismo. Cualquier omisión, descuido o falla en alguno de estos pasos dificulta la esterilización y como consecuencia significa poner en riesgo la salud del paciente y la del personal del consultorio.

Es importante recordar que para identificar a tiempo el fracaso en un ciclo de esterilización y tomar medidas al respecto, debe hacerse uso de los IB, ya que son el único medio para verificar los ciclos de esterilización.

Existen en el mercado una gran variedad de IB, pero no todos cumplen con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas de las cepas de *Bacillus* correspondientes a la ATCC, ni cumplen con las especificaciones de la FEUM, que garantizan su calidad y confiabilidad para ser utilizados como verificadores.

La FEUM establece que para los procesos de esterilización por calor seco u óxido de etileno, se deben de emplear esporas de una subespecie de *B. subtilis* (ATCC 9372), y para los procesos por vapor se emplea *B. stearothermophilus* (ATCC 7953) por la resistencia que presentan a esta forma de esterilización.

Con base a los resultados del estudio se comprobó que los IB de las marcas Merck, Becton and Dickinson, MDT y Raven, contienen las endoesporas correctas para el tipo de esterilización que se recomienda en su etiqueta. Los IB de la marca Belsa para verificar ciclos por vapor de



agua, presentaron una morfología diferente a las especies estudiadas, en las pruebas bioquímicas sus resultados fueron iguales a los de *B. subtilis*, pero sin pertenecer a la variedad niger como lo demostró su falta de pigmentación negra.

En la FEUM se señalan las características de empaque y la información que deben de contener los IB para su correcto uso, manejo y cuidados.

Los resultados del estudio mostraron que todos los IB poseen un instructivo para su correcto uso, pero no significa que reúnan todas las especificaciones que señala la FEUM, y no garantiza que la información que se brinda sea la correcta.

Lo anterior hace necesario que el usuario, tenga conocimiento sobre las características de las endosporas utilizadas como IB, así como de los requisitos que deben de cumplir como tales.

La temperatura de incubación de los IB no puede ser arbitraria, la FEUM establece que para *B. subtilis*, la temperatura de incubación es de 37°C y para *B. stearothermophilus* es estrictamente a 57°C.

En el instructivo de la marca Belsa, se indica que la temperatura de incubación de los IB para verificar los ciclos a vapor es de 30 a 35°C; incluso en este estudio se utilizó la temperatura ambiente, para la incubación de los IB, porque marcas como Belsa, han llegado a sugerir la incubación a temperatura ambiente dentro del consultorio dental.

Los resultados mostraron que las endosporas de *B. subtilis*, de todas las marcas incluyendo las cepas de la ATCC, a temperatura



ambiente llegan a desarrollarse pero en muy poca cantidad y, *B. stearothermophilus* definitivamente no presenta crecimiento.

Debido a la diversidad de climas, dependiendo de la zona geográfica, la estación del año y aún en un mismo lugar existe variación dependiendo de la hora del día, razones por las que la incubación a temperatura ambiente no es confiable.

Así mismo, la FEUM dice que cuando un IB es utilizado fuera de las indicaciones y recomendaciones de uso, la verificación mínima de sus parámetros de resistencia sería insuficiente, por lo que deberá validarse para los propósitos reales de uso y para las condiciones en las cuales se va a aplicar.

En el departamento de control analítico de la Facultad de Química, se realizaron pruebas para comprobar la efectividad de los IB de la marca Belsa. Las pruebas se basaron en las indicaciones del fabricante y no con base a las especificaciones de la FEUM.

Los diferentes IB analizados, de acuerdo a su presentación y manejo, presentan ventajas y desventajas importantes para la selección de un IB, las cuales se muestran en la tabla 8.



Tabla 8.- Ventajas y desventajas de los IB de acuerdo a su presentación

Característica	Ventaja	Desventaja
Presentación en ampollitas de cristal	<ul style="list-style-type: none">• No requiere de un medio de cultivo.• No se expone la suspensión de esporas al medio ambiente al incubar.• Es de práctico manejo, cuando se posee un incubador en el consultorio.• Facilitan la detección del crecimiento de endosporas, por el cambio de color del medio.	<ul style="list-style-type: none">• Requiere de refrigeración.• Es frágil.• Requiere manejarse con cuidado si se va a enviar al laboratorio para obtener los resultados.• Solo pueden utilizarse en vapor de agua a presión.
Presentación en tiras o discos de papel filtro.	<ul style="list-style-type: none">• Se pueden enviar fácilmente al laboratorio.• No requieren refrigeración.• Existen con <i>B. subtilis</i> y con <i>B. stearothermophilus</i>, contenidos en un mismo IB o por separado.	<ul style="list-style-type: none">• Se puede dañar el empaque durante la manipulación y contaminarse.• Requiere de la preparación de un medio de cultivo y del sembrado del IB en condiciones asépticas.
Los IB que incluyen las endosporas y el medio de cultivo en ampollitas de cristal separadas.	<ul style="list-style-type: none">• No requiere la preparación del medio de cultivo.• Se pueden verificar los ciclos por calor seco y por vapor de agua a presión.	<ul style="list-style-type: none">• Requieren refrigeración.• Requiere de condiciones asépticas para incluir el IB al medio de cultivo.• Una vez abierta la ampollita que contiene el medio queda expuesta al medio ambiente, por lo que se puede contaminar fácilmente.• No es factible el envío al laboratorio una vez abiertas las ampollitas y pueden llegar a romperse.



Otro dato importante a considerar al momento de elegir un IB, es conocer la cantidad de esporas que contiene, marcas como Merck y Belsa, manejan la cantidad de endosporas de sus IB dentro de un rango, mientras que las marcas Becton and Dickinson, Raven y MDT, proporcionan el número exacto, lo que significa que tienen un mejor control de calidad en la elaboración del verificador.

Las recomendaciones para saber cuando realizar un monitoreo biológico se proporcionan a continuación:

- Siempre realizarlo por lo menos una vez a la semana.
- Al realizar la instalación por primera vez de un aparato de esterilizado.
- Después de cualquier reparación.
- Cuando la carga por esterilizar contenga cualquier tipo de implante; este no podrá colocarse hasta no tener los resultados de la prueba biológica.
- Cuando ha sufrido cambios la configuración de la carga (en su tipo de empaque ó respecto a los productos o materiales que contiene).

Con este estudio se brinda la información necesaria para poder elegir correctamente un Indicador Biológico, dependiendo de las necesidades de cada usuario y de las ventajas y desventajas que ofrecen los IB existentes en nuestro país, tomando en cuenta el cumplimiento de las especificaciones establecidas por la ATCC y la FEUM.

Se agradece a los distribuidores de las marcas Merck, Belsa y Raven, la donación de IB para la realización de este estudio.



ANEXO 1.- AGAR NUTRITIVO.

Formula por litro:

Peptona	5.0 g
Extracto de carne de res....	3.0 g
Agar.....	15 g

Preparación:

1. Se suspenden 23 gramos del polvo en un litro de agua destilada.
2. Mezclar bien y dejar reposar hasta que la mezcla sea uniforme.
3. Se calienta suavemente agitando y se hierve durante uno o dos minutos o hasta su disolución completa.
4. Esterilizar a 121° C con 15 lb de presión durante 15 minutos.
5. Su pH final es de 6.8 ± 2 .
6. Vertir la preparación en cajas petri.



ANEXO 2.- CUANTIFICACIÓN DE UFC.

Material

- Tubos de 12 x 75 con solución salina
- Pipeta de 10ml
- Micropipeta
- Gradilla
- Vortex
- Cajas Petri con agar nutritivo
- Rodillo

Método

1. Por cada Indicador Biológico se realizará una siembra por triplicado en agar nutritivo.
2. Si el producto es sólido se disuelve en 10ml de sol. salina isotónica para desestresar a las esporas agitando en el vortex n°. 4 por 30 segundos. Si el producto es líquido, tomar 100 μ y proceder con las diluciones.
3. Tomar 1ml de la muestra y diluir hasta 10⁶.
4. Sembrar en 20 ml de agar nutritivo por la técnica de caja vertida.
5. Cuando la determinación se realiza por triplicado se preparan tres series de diluciones iguales y se procede a sembrar una caja con cada dilución de las tres series, con la que se tiene la determinación por triplicado.
6. Incubar las cajas a 37° ó 57°C dependiendo del tipo de bacilo (*B. subtilis* ó *B. stearothermophilus*).
7. Contabilizar y registrar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24 horas.



ANEXO 3.- IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.

Tinción de Gram

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos recomienda que para verificar la ausencia de otros microorganismos se realizará la observación microscópica de frotis teñidos con tinción de Gram (MGA 0921).

Material

- Microscopio
- Portaobjetos
- Asa
- Mechero
- Gradilla
- Cultivo de 24 horas de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*
- Reactivos: cristal violeta, Lugol. Alcohol-acetona y Safranina

Método

1. Hacer un frotis del microorganismo.
2. Cubrir la preparación con cristal violeta, dejar reaccionar por 1min. y lavar.
3. Cubrir la preparación con lugol dejarlo 1min. escurrir el exceso de reactivo y lavar.
4. Agregar a la muestra sosteniéndola ligeramente inclinada alcohol - acetona, tan pronto como las gotas ya no arrastren color, lavar con agua.
5. Por último agregar el colorante de contraste (safranina), y observar al microscopio con 1,000X.



ANEXO 4.-TINCIÓN CON AZÚL DE ALGODÓN.

Para poder observar microscópicamente a las esporas con claridad se utilizó azul de algodón.

Material

- Microscopio
- Portaobjetos
- Asa de siembra
- Colorantes: azul de algodón
- Cultivo de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*.

Método

1. Preparar un frotis del microorganismo a observar.
2. Colocar una gota de azul de algodón.
3. Cubrir la preparación con un cubreobjetos.
4. Observar al microscopio, con objetivo de inmersión.



ANEXO N° 5.- PRUEBA DE CATALASA.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo a aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular, éste es letal para las células bacterianas. La mayoría de las bacterias aerobias y facultativas poseen actividad de catalasa.

Material

- Cajas Petri con triptosa fosfato agar o agar nutritivo.
- Agua oxigenada al 3.0%.
- Cultivos de 24 horas de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*.

Método

1. Con lápiz grueso, dividir la parte de la caja en cuatro sectores.
2. Identificar los sectores 1 y 2 con el nombre de los microorganismos indicados, el sector 3 con "P"(problema), y el 4° con "C" (control).
3. Sembrar con estría recta, inoculando un microorganismo en cada sector.
4. Invertir las cajas e incubar a 35°C durante 24 - 48 hr.
5. Agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre el desarrollo microbiano.
6. Interpretar la reacción como positiva o negativa en el caso de no observar ninguna liberación de oxígeno.
7. Registrar los resultados en la hoja tabular.



ANEXO N° 6.- HEMÓLISIS DE AGAR - SANGRE

La base de agar sangre ayuda al aislamiento, cultivo y determinación de la actividad hemolítica de diversos microorganismos.

La gran diversidad entre especies de bacilos está ejemplificada por su metabolismo, todas son quimioheterótrofas y pueden degradar diversos sustratos orgánicos como aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares para obtener carbono y energía y son colonias hemolíticas catalasa - positiva .

Material

- Cajas Petri
- Base de agar- sangre
- Cultivo de *B. subtilis*
- Sangre de cordero defibrinada

Método

1. Suspender 40g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y remojar durante 5 y 10 min, hervir durante un minuto.
2. Esterilizar a 121°C durante 20 min.
3. Después de esto enfriar a 45°-50° y añadir de 5 a 10% de sangre defibrinada estéril, homogeneizar y vaciar en cajas petri estériles.
4. Sembrar con estría recta el microorganismo, e incubar durante 24 horas a 37°C.
5. Observar y anotar en una hoja tabular los resultados como positiva o negativa la presencia o ausencia de hidrólisis respectivamente.



ANEXO Nº 7.- REACCIÓN DE VOGES - PROSKAUER.

Se utiliza para identificar bacterias que al degradar la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta, produce acetona como principal subproducto y menos cantidad de ácidos fuertes.

Material

- Tubos de 12 x 75 con caldo RM/VP
- Pipetas de 1.0ml
- Cultivo de 24 horas de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*.
- Alfa naftol
- Hidróxido de potasio al 40%

Método

1. Identificar los tubos e inocularlos con el microorganismo correspondiente.
2. Incubar durante 24 horas a 37° y 57°C correspondientemente.
3. Al finalizar el periodo de incubación, añadir 0.6 ml de alfa naftol y 0.2 ml de hidróxido de potasio (es esencial agregar los reactivos en ese orden).
4. Agitar cuidadosamente los tubos para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlos reposar durante 10-15 minutos.
5. Observar e interpretar los resultados como positivo o negativos y registrarlos en la hoja tabular.



ANEXO N°8.- CRECIMIENTO ANAEROBIO.

La mayoría de las especies de bacilos presentan su mejor crecimiento en presencia de oxígeno, sin embargo algunas especies son anaerobias facultativas.

Material

- Cajas Petri o tubos con agar sangre
- Cultivo de *B. subtilis* y *B. stearothermophilus*.
- Cámara de anaerobiosis

Método

1. Colocar las cajas Petri con agar dentro de la campana junto con el cultivo de microorganismos.
2. Sembrar el microorganismo con estría recta e incubar mínimo durante 48 horas
3. Observar la presencia de crecimiento y registrar los resultados como positivos o negativos.



ANEXO N° 9.- HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN.

Se utiliza para identificar bacterias que tienen la capacidad de hidrolizar diversos sustratos orgánicos.

Material

- Lápiz graso o marcador
- Mechero
- Asa, portasa
- Gradilla
- Cajas Petri con agar almidón
- Cultivo puro de 24 horas de desarrollo de gelosa nutritiva de: *B. subtilis*
- Solución de yodo yodurada (Iugol)

Método

1. Con el lápiz graso o con un marcador, dividir la parte externa de la caja en cuatro sectores.
2. Identificar los sectores 1 y 2 con el nombre del microorganismo indicado, el sector 3 con "P" (problema) y el 4 con "C" (control).
3. En condiciones de asepsia, tomar una asada del cultivo indicado e inocular el sector 1, sembrando por estría recta empezando por el borde de la caja.
4. Repetir el procedimiento, inoculando los sectores 2 y 3 con los microorganismos control.



-
5. El sector "C", se deja sin sembrar y se utiliza como control de esterilidad del medio, así como de testigo de reacción del almidón.
 6. Invertir las cajas, incubar a 37°C durante 24-48 horas
 7. Después de la incubación, cubrir la superficie de la caja con solución de lugol.
 8. Observar la reacción, anotando los resultados como positivos o negativos en la hoja tabular.



REFERENCIA

1. - **Miller C.H:** Update on heat sterilization and sterilization monitoring. *Comp, end Contin Educ Dent.* vol XIV (3): 304-314
2. - **Miller C.H:** Instrument recirculation prevents infection transfer. *RDH* 9(4): 18-21. 1989
3. - **Council on Dental Materials, Instruments, and Equipment; Council on Dental Practice; and Council on Dental Therapeutics.** Infection control recomendations for the dental office and the dental laboratory; *JADA* 116(2):241-248, 1988
4. **Acosta E. y Maupome G.** Esterilizacion del instrumental. *Revista Práctica Odontológica.* 14:(11) 111-133, 1993.
5. **CDC.** Recommended Infection Control Practices for Dentistry, 1993, vol 41, no RR-8pp 1-1.
6. **OSAP. Reseach Foundation.** Biologic Indicators. Focus no 7, 1-4, 1997.
7. **ADA.** Biological indicators for verifying sterilizations . *JADA* 117 (10): 653-654, 1988.
8. **Miller C.H:** Sterilization: the first choice. *RDH* 10: 34,36, 1989.
9. **Association for the Advancement of Medical Instrumentation AAMI:** Selectiun and use of chemical indicators for steam sterilization monitoring in health care facilities. *AAMI TIR N.3* 1988.
10. **Kolstad, Robert.** The emergence of load-oriented sterilization, *JADA,* vol 125:51-54, 1994.



11. **Association for the Advancement of Medical Instrumentation.**
"Steam sterilization and sterility assurance in office-based, ambulatory-care medical and dental facilities" ANSI/AAMI St 40-1992 Arlington (vir): AAMI, 1992, American National Standard.
12. **Association for the Advancement of Medical Instrumentation.**
"Table-top dry heat (heated air) sterilization and sterility assurance in dental and medical facilities" ANSI/AAMI ST 40- 1992. Arlington (vir): AAMI, 1992, American National Standard.
13. **Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994 .**"Para la prevención de enfermedades bucales". Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación, Enero 6, 1995.
14. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta Edición.**
Métodos generales de análisis pp 165-172. Secretaría de Salud. México D.F 1994.
15. **Miller C.H Sheldrake Ma.** The ability of biologic indicators to detect sterilization failures. Am .J.Dent 1994, 7(2): 95-97.
16. **United States Pharmacopeia. Vol XV** Rockville, Maryland. United States Pharmacopeial Convention Inc. 1995.
17. **American Type Culture Collection, R, Gherna P. Pienta and R. Cote,**
18th edition, 1992.
18. **Bernad J. Henry:** Diagnostico y tratamientos clínicos por el laboratorio 9º edición, Edit. Masson-Salvat. 1994.
19. **Frobischer. Microbiología. Trad, R. Espinosa, A. Fuch 14ª de.**
México, 1987



-
20. Magoon C.A: Studies upon bacterial spores, J. Bact. 11: 253-283, 1926
21. Claus D. and Berkeley R.C.W. 1986. Genus Bacillus. Cohn 1872 in :
Beger's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, Begery's Manual
Trus, Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1105-1139
22. Brooks F. Microbiología Médica . Manual moderno 15^a de. México
23. Ramirez R.M. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad
de Química, 2^a ed, UNAM, 1995.
24. Mc. Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de
importancia clínica. pag. 212-216, capítulos. 5, 22. Ed. panamericana.
1990.