

Efecto bactericida de “DESINFECT” sobre aislamientos clínicos de *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y una cepa de catálogo de *Bacillus subtilis*.

Cruces Becerra E. A., García Aguilera J. R., Morlan Mejía J.,
Sanabria Urbán O. S., Sánchez Luna O. I.

INTRODUCCIÓN

Según datos de la secretaria de salud, correspondientes a 1998, en México, la infraestructura hospitalaria es de 120 mil 620 camas. Cada una genera en promedio cuatro kilogramos de basura por día. Aunando a este volumen los desechos producidos por clínicas no registradas, centros de investigación, pequeños consultorios e incluso veterinarias, el total de desechos hospitalarios en el país asciende a 482 toneladas diarias.

Parte de estos desechos hospitalarios representan los llamados Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI), que de acuerdo con la norma mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 son todos aquellos materiales que se generan durante los servicios de atención médica y que contienen agentes biológicos infecciosos, tales como hongos, bacterias, virus y toxinas, que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Algunas de las bacterias que pueden encontrarse en estos desechos están *Staphylococcus aerus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, estas relacionan con fiebres hemorrágicas y enfermedades en las vías respiratorias como: faringoamigdalitis, neumonías y tuberculosis, entre otras, que son de gran importancia médica por su alta incidencia en los centros de salud.

El manejo adecuado y seguro de los RPBI, en centros de salud y algunos hospitales, se rige bajo los lineamientos de la norma mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, la cual establece los criterios para el almacenamiento adecuado y tratamiento

previo a su transportación a los basureros municipales. Sin embargo el 95% de los

consultorios, clínicas, centros de investigación, pequeños laboratorios y veterinarias, llamados también microgeneradores, desconocen los lineamientos para el manejo adecuado de estos residuos (Gómez, 2004).

Los procedimientos de desinfección de los RPBI, son la incineración, desecación, radiación, calor seco y húmedo (Joseph, 1990). No obstante de representar a los métodos más eficaces para su esterilización, existe la posibilidad de que no eliminen esporas. Además de que no pueden ser utilizados en residuos líquidos aunado a la infraestructura y recursos económicos que se necesita (Prescot et al, 2004).

Otro método se basa en la utilización de agentes químicos, como: alcoholes, aldehídos, ácidos, bases, alógenos (I y Cl), óxido de etileno, entre otros. El óxido de etileno se utiliza ampliamente por su reactividad con la capa lipídica celular y en ácidos nucleicos, actuando como agente alquilante, aunque es sumamente tóxico y nocivo al ambiente (Jawetz et al, 2004).

Actualmente se están desarrollando nuevos productos como agentes desinfectantes, tal es el caso de *DESINFECT*, un producto desarrollado por Sánchez y col. en 2004, que consiste en una mezcla acuosa de detergente no iónico, óxido de etileno como agente activo y otros compuestos (reservados por el autor), se considera un desinfectante de amplio espectro biodegradable y de fácil manejo. Los fabricantes del producto probaron el desinfectante sobre RPBI procedentes de un consultorio dental. Para lo cual permitieron un tiempo de contacto de los RPBI con el desinfectante de 24hrs. Sembraron en

medios selectivos y de enriquecimiento a fin de asegurar el crecimiento de bacterias u hongos. No se registró crecimiento por lo que concluyeron el efecto inhibitorio del producto. Sin embargo, en el estudio no se contempló el aislamiento inicial de los probables microorganismos presentes.

Con respecto a la evaluación de la efectividad de un desinfectante la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología (DGHM, por sus siglas en alemán), propone el Test de Suspensión además del método ya existente de la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria y Mínima Concentración Bactericida (MCI, MCB, por sus siglas en inglés), por la Técnica de Difusión en Agar y Caldo. En este sentido Rueda y col. En el 2004 comparo estos tres métodos y afirma que son factibles de usarse al no observar diferencias en los resultados.

Por otro lado la norma mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 propone a *Bacillus subtilis* como control de calidad, para la evaluación de desinfectantes, dada la resistencia que presenta en contra de tratamiento químicos, atribuido a las esporas que éste produce.

Por lo tanto el siguiente proyecto tiene como objetivo: Evaluar el efecto bactericida o bacteriostático de DESINFECT en aislamientos clínicos de *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y una cepa de catálogo de *Bacillus subtilis* utilizando la técnica propuesta por la DGHM y las de MIC y MBC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del desinfectante

DESINFECT fue proporcionado por el fabricante. El producto tiene una concentración de 20% de mezcla activa (óxido de etileno, detergente no iónico y otros compuestos [reservados por el autor]) y un 80% de agua como compuesto inerte.

Cepas Bacterianas

Los aislamientos clínicos de *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron proporcionados por el HOSPITAL CEYLAN, y *Bacillus subtilis* por la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI).

Las bacterias se conservaron en placas de agar Casoy para *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* y agar Base sangre suplementado con 5% de eritrocitos de bovino para *Streptococcus pyogenes* a 4° C.

Pruebas de susceptibilidad bactericida

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana se llevaron a cabo tomando como control de calidad a *Bacillus subtilis*.

Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria y la Mínima Concentración Bactericida.

Utilizando placas de agar Casoy para *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y agar sangre de bovino para *Streptococcus pyogenes*, se realizaron cultivos de 24h y se cosecharon las bacterias con solución salina fisiológica estéril. La cosecha bacteriana se centrifugo a 5000rpm durante 10min. La pastilla formada se resuspendió en caldo nutritivo, para *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* y medio infusión cerebro corazón (BHI, por sus sigla en inglés), para *S. pyogenes*. La suspensión celular se ajusto al estándar 1 de McFarland, equivalente a 3×10^8 UFC/ml.

Partiendo de la concentración de la mezcla activa en el desinfectante, (20%), se realizaron diluciones seriadas en caldo nutritivo y medio BHI, Iniciando con una concentración de 6.66% hasta 0.000406% . se agrego 1ml de inóculo estandarizado. Los tubos se incubaron a 35°C por 24hrs, utilizando como controles al medio de crecimiento con el desinfectante y el medio de crecimiento con el inóculo bacteriano. El ensayo se realizó por duplicado.

Los tubos en los que ya no se observo crecimiento bacteriano, se sembraron por duplicado en placas de agar Müller Hinton (MH) para, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* y en agar Sangre de bovino para *S. pyogenes*. Se incubaron a 35°C por 24Hrs. La interpretación de los resultados se llevo a cabo considerando a las placas de la concentración que consiguió la ausencia total de colonias bacterias como la concentración mínima bactericida (MBC) y a las placas de la concentración siguiente, en orden descendente de concentración, como la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (MIC).

Test de suspensión DGHM

De un cultivo de 24hrs. se realizaron suspensiones celulares en caldo MH y BHI (ver determinación de MCI y MCB). Se agregó la concentración del desinfectante que correspondió a la MBC de cada una de las bacterias, con un tiempo de contacto de 0, 2, 4, 6, 8 y 9hrs, se plaquearon 10µl en placas de MH y agar Sangre, Se dejaron incubar a 35°C por 24hrs. Se realizo por duplicado. Se registró el crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Se evaluó el efecto bactericida de *DESINFECT* siguiendo el método de la MBC y el test de suspensión DHGM. La concentración mínima bactericida y mínima inhibitoria del desinfectante obtenidas en cada una de las bacterias ensayadas se muestran en la tabla 1.

| Bacteria | MIC % de DESINFECT | MBC % de DESINFECT |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0.1041 | 0.2033 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 3.33 | 6.66 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 0.006 | 0.013 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0.006 | 0.013 |

Tabla 1. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria y Mínima Concentración Bactericida del desinfectante a las 24 h.

En el test de suspensión DHGM, en donde se evaluó la MBC del desinfectante obtenida de cada una de las bacterias a un tiempo de contacto de 0, 2, 4, 6, 8 y 8.5Hrs, no se observó efecto bactericida para *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* en ninguno de los tiempos de contacto asignados. Aunque para el caso de *Streptococcus pyogenes* el efecto bactericida del desinfectante se mostró al tiempo 0.

DISCUSIÓN

Se observa que el desinfectante presenta una MBC de 0.013 % para las bacterias *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, las cuales son bacterias Gram (-). Esta similitud en cuanto a la MCB puede atribuirse a la química de las membranas de ambas bacterias, pues como lo reporta Wolfgang y col. en el 2004 poseen (en concentraciones ligeramente variables de acuerdo a la especie) fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacaridos muy susceptibles a agentes alquilantes como el oxido de etileno que actúa sobre las cadenas hidrocarbonadas, grupos sulfidrilo (SH) y amino (NH₂).

En el 2004 Rueda y col. reportan a las sales de amonio cuaternario como efectivas en contra de *P. aeruginosa* a una MCB de 0.49%. Así mismo Estrela y col. en el 2003 reportan al hipoclorito de sodio como agente bactericida sobre la misma bacteria con una MCB de 2%. Dichos agentes químicos tienen sitios de acción semejantes al oxido de etileno, por lo que se puede asumir que *DESINFECT* es mas efectivo que las sales cuaternarias y el hipoclorito de sodio frente *P. aeruginosa*.

Se observo que *B. subtilis* (bacteria Gram positiva), fue mas resistente a *DESINFECT* con respecto a las *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (bacterias Gram negativas), aun cuando estas ultimas presentan mayor

resistencia a los biocida en comparación con bacterias Gram (+), debido a su membrana externa que impide y retrasa la entrada del agente químico al interior de la célula. La resistencia de *B. subtilis* es atribuida a la generación de esporas que la bacteria produce, las cuales poseen membranas rígidas de características proteicas, que aunque son el blanco de agentes alquilantes (como el oxido de etileno, agente activo de DESINFECT), representan una gruesa barrera física que reduce y retrasa la asimilación de dichos compuestos al interior de la célula (Wolfgang, 2004). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Estrela y col. en el 2003, en donde a una concentración de 2% de hipoclorito de sodio sobre *B. subtilis* no tuvo efecto bactericida siendo que la misma concentración para *P. aeruginosa* si presento dicho efecto.

Por otra parte la MCB obtenida por *S. pyogenes* de 6.66% del desinfectante fue superior a la MCB obtenida para las bacterias Gram (-) e incluso también fue mayor que la de *B. subtilis*. Estos datos no ajustan con lo esperado teóricamente, pues al ser *S. pyogenes* una bacteria Gram (+) y no esporulativa se esperaba que mostrara una MCB inferior a las presentadas por *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (0.013% del desinfectante). Este fenómeno de resistencia podría estar relacionado con la presencia en la superficie celular de *S. pyogenes* de estreptolisinas S, que son proteínas estables al oxígeno (Tay y col., 2003). Es este punto King y col. en el 2000 reportan la existencia de enzimas homologas a la catalasa y peroxidasas presentes en *S. pyogenes* y en otras bacterias aerobias, dichas enzimas actúan como defensas a las especies reactivas de oxígeno, principalmente al peroxido de hidrogeno. La estreptolisina S y las enzimas homologas a las peroxidasas, ambas presentes en *S. pyogenes* podrían haber brindado a la bacteria resistencia sobre el oxido de etileno (presente en DESINFECT) que de igual manera es una especie reactiva de oxígeno.

Otro factor que pudo verse involucrado en la en la resistencia de *S. pyogenes* es el hecho de que esta bacteria era un

aislamiento clínico que en comparación con *B. subtilis* que fue una cepa de catalogo. Esto podría indicar la existencia de una nueva cepa resistente de *S. pyogenes* al oxido de etileno. Por lo que se sugiere realizar estudios sobre la resistencia de *S. pyogenes* a agentes alquilantes, probados en diferentes cepas de *S. pyogenes*.

En cuanto al test de suspensión DGHM se pudo observar que el desinfectante no tuvo efecto bactericida sobre *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* a 8 ½ h de exposición directa al desinfectante, mientras que a 24 h se pudo observar un efecto bactericida en las tres bacterias anteriores, este fenómeno se puede atribuir en las bacterias Gram (-) a la presencia de la membrana externa la cual pudiera retardar el paso del oxido de etileno para su modo de acción. Mientras que para *B. subtilis* la resistencia podría atribuirse principalmente a las esporas que produce la bacteria. Sin embargo entre los tiempos de 0 a 8 ½ h en intervalos de 2 horas, si se observo una disminución gradual de las poblaciones, por lo que se espera que si los tiempos se extienden de 9 a 24 h se podría determinar el tiempo mínimo de contacto de DESINFECT sobre los aislamientos clínicos experimentados.

En cuanto a *S. pyogenes* se pudo observar que el efecto bactericida de DESINFECT se presento en el tiempo 0, esto podría estar relacionado principalmente por la alta concentración de desinfectante con la cual se puso en contacto.

CONCLUSION

DESINFECT no tuvo efecto bactericida sobre los aislamientos clínicos de *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* durante las primeras 8 ½ h de de contacto y si tuvo tal efecto sobre *S. pyogenes* en su primer tiempo (tiempo 0). Sin embargo DESINFECT mostró efecto bactericida sobre *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. pyogenes* en un tiempo de contacto de 24 h.

Las concentraciones de DESINFECT sobre las bacterias Gram (+) fueron mayores que

las que se determinaron para las bacterias Gram (-).

DESINFECT mostró efecto bactericida sobre *B. subtilis* se puede recomendar como un desinfectante efectivo, ya que como lo cita la norma mexicana NOM-

ECOL-087-2000 esta bacteria sirve como bioindicador para la determinación de un desinfectante.

BIBLIOGRAFIAS

Gómez G. R., 2004, El manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos en los consultorios dentales. Estudio de campo, Revista ADM 2004; 61 (4): 137-141

Konaman E. W., 1999, diagnostico microbiológico, medica panamericana, Buenos Aires Argentina, Quinta edición, 1432 p

Norma Oficial Mexicana NOM-087 –ECOL –SSA1 -2002, Protección ambiental – Salud ambiental –Residuos peligrosos biológico infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

Prescott L. M., Harley H. P., Klein D. A., 2004, Microbiologia, segunda edición, Madrid España, Mc Graw-Hill Interamericana, 1240p.

Wolfgang D. B. and Ulrike M., 2004, **Plant responses to bacterial quorum sensing signals** Current Opinion in Plant Biology, edición 4, Volumen 7 , Pages 429-433