

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIOS BAGÓ DE BOLIVIA S.A.



**EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DE
LOS DESINFECTANTES EN CEPAS BACTERIANAS
ATCC Y CEPAS AISLADAS DEL ÁREA DE
FABRICACIÓN DE PRODUCTOS ESTÉRILES,
REALIZANDO PRUEBAS DE DILUCIÓN “*in use*” EN
LABORATORIOS BAGÓ DE BOLIVIA S.A**

Elaborado por:

Mamani Urquizo Irma

**“PROYECTO DE GRADO PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA.”**

**La Paz – Bolivia
2008**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. MARCO TEORICO	4
A. Tipo de agente químico antimicrobiano:	4
B. Mecanismo de Acción	4
C. Clasificación de los desinfectantes según su actividad	6
1. Desinfectantes de bajo nivel.....	6
a) <i>Compuestos de amonio cuaternario</i>	6
b) <i>Compuestos mercuriales, “Timerosal”</i>	7
2. Desinfectantes de nivel intermedio	8
a) <i>Compuestos clorados. “Hipocloritos”</i>	8
b) <i>Alcoholes</i>	9
3. Desinfectantes de alto nivel.....	10
D. Factores que afectan la potencia de los antisépticos y desinfectantes.....	11
1. Concentración del agente y tiempo de exposición	11
2. pH.....	12
3. Temperatura	12
4. Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana.	12
5. La naturaleza de material que acompaña a los microorganismos (materia orgánica, etc.).....	12
E. Características y propiedades de un desinfectante ideal	12
F. Rotación de los desinfectantes.....	13
G. Efectos del mal uso de los desinfectantes	14
H. Evaluación de la eficacia Bactericida de los desinfectantes.....	15
1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	16
2. Test de Ridel Walter.....	16
3. Test de Kelsey-Sykes (test de capacidad)	16
4. Prueba de Kelsey y Maurer	17
5. Determinación de la Viabilidad.....	17
6. Control de la Neutralización	17
7. Control de toxicidad del Neutralizante.....	18
8. Métodos de análisis de la AOAC	18
II. JUSTIFICACIÓN.....	19
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV. OBJETIVOS	21

A.	Objetivo General.....	21
B.	Objetivos Específicos.....	21
V.	FORMULACIÓN DE LAS HIPOTESIS	22
A.	Hipótesis General.....	22
B.	Hipótesis Específica	22
VI.	DISEÑO METODOLOGICO	23
A.	Descripción del Ámbito en Estudio	23
B.	Ámbito de Investigación.....	23
C.	Microorganismos	23
VII.	MATERIALES Y METODOS.....	24
A.	Materiales, Reactivos y Medios.....	24
B.	Metodología	25
C.	Preparación del inóculo	25
D.	Prueba de viabilidad.....	26
E.	Control de Neutralización del Desinfectante	26
F.	Control de Toxicidad del Neutralizante.....	26
G.	Método	26
H.	Procesamiento de la variable en estudio	27
VIII.	RESULTADOS	31
IX.	DISCUSIÓN.....	40
X.	CONCLUSIONES	45
A.	Conclusión General.....	45
B.	Conclusiones Específicas.....	45
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

RESUMEN

La gran problemática existente en la industria farmacéutica frente al control de la contaminación microbiana, y la selección mas apropiada de antisépticos y desinfectantes; nos lleva a implementar métodos válidos y eficientes para evaluar la efectividad de estos compuestos.

Es muy grande, la capacidad de los microorganismos, de adaptarse a los agentes bactericidas o bacteriostáticos. Y además que no todas las bacterias son susceptibles a ser atacadas por los desinfectantes, por sus características morfológicas.

El método elegido para el estudio, es el ensayo de dilución en uso. La metodología del trabajo fue establecida, de acuerdo a los lineamientos expuestos en la USP 30 y a los procedimientos establecidos por la A.O.A.C. para la evaluación de la eficacia bactericida de desinfectantes.

Se trabajaron con 5 desinfectantes: TEGO 51, Germekil, Timerosal, Lavandina, alcohol. Los cuales se enfrentaron a 6 cepas: 3 cepas de referencia ATCC y 3 cepas aisladas del ambiente de fabricación: *Staphylococcus aureus*, *Eschea richia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp*, *Micrococcus spp*.

Cada estudio se realizó por triplicado, y se comparo la acción desinfectante de cada producto expresado como porcentaje de eficacia bactericida, se observo que:

TEGO 51, Germekil, Lavandina presentan una eficacia Bactericida a tiempos mayores a 5 minutos de exposición. La cepa *Pseudomonas aeruginosa*, presenta mayor resistencia al ataque del timerosal y el alcohol. Las cepas aisladas, presentan resistencia a 4 de 5 desinfectantes. Siendo la lavandina la que no disminuyo la eficacia después de 2 años de uso. La actividad Bactericida del Germekil, TEGO 51 y Lavandina es óptima para la desinfección de los ambientes estériles de fabricación; ya que las cepas control y cepas aisladas sufrieron una reducción del 99.999% de acuerdo al limite establecido por el test de Chambers, a tiempos y concentración de exposición referidas por el fabricante. El timerosal y el alcohol se consideran ineficientes para realizar la sanitización por presentar una reducción inadecuada de bacterias a un tiempo de exposición superior a los 15 min.

INTRODUCCIÓN

La limpieza y desinfección son generalmente las formas más efectivas, dentro de la industria farmacéutica, para controlar la contaminación microbiana. Las áreas limpias deben mantenerse de conformidad con normas apropiadas de limpieza, a las cuales se debe suministrar solamente aire que ha pasado por filtros de comprobada eficiencia¹; además, los requisitos para el procesamiento aséptico incluyen: pisos, paredes y techo fáciles de limpiar, con superficies lisas y no porosas; control de temperatura, humedad y partículas, y procedimientos de limpieza y desinfección que provean y mantengan las condiciones asépticas.²

De conformidad con las BPM vigentes, al usarse desinfectantes, debe utilizarse más de un tipo, cambiándolos periódicamente. Deben efectuarse controles periódicos a fin de detectar cepas de microorganismos resistentes.³

La seguridad y la calidad de un medicamento esta ligado a los procedimientos de limpieza y desinfección que sean aplicados en cada una de las etapas del proceso, por ello se deben implementar sistemas seguros que permitan evitar la contaminación relacionada con los agentes microbianos. Si se realiza con eficacia y en el momento apropiado, su efecto neto será la eliminación de estos contaminantes. Por tanto, los desinfectantes y antisépticos, constituyen un arma eficaz en la lucha y prevención de la contaminación causada por microorganismos.

Los desinfectantes son productos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies. Su eficacia depende de los factores tales como tipo de desinfectante, pH del medio, presencia de materia orgánica y naturaleza de los microorganismos.

El control del crecimiento bacteriano es un objetivo importante al nivel de producción industrial y esta dada por la muerte bacteriana o la inhibición del crecimiento mediante procedimientos: físicos, agentes químicos. Los principales motivos para controlar

¹ Ministerio de Salud, **Normas de Buenas Practicas de Manufactura**, Pág. 85

² “Desinfectantes y antisépticos” <1072> USP 30 Versión en español. Pág. 554

³ Ídem 1, Pág. 95

el crecimiento de los microorganismos son la de prevenir la contaminación, la proliferación de agentes patógenos.

Mediante estudios se sabe que la exposición mantenida de agentes antimicrobianos o antibióticos puede generar cambios estructurales en los microorganismos, los cuales son ejecutados por los microorganismos para asegurar la supervivencia, a este cambio se denomina “*Adaptación*”, para evitar este fenómeno es que se hace necesario el empleo de diferentes sustancia desinfectantes. Realizando además la rotación de los mismos (Norma BPM vigentes).

La valoración del poder antimicrobiano de un desinfectante químico, puede efectuarse determinando su poder bacteriostático y bactericida, existiendo diferentes métodos utilizados para esta valoración. También existen otros métodos para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes que pueden ser utilizados dependiendo del tipo de microorganismos y desinfectante a ser ensayado, entre estos métodos podemos mencionar el método de Ridel-Walter que evalúa el coeficiente fenólico, Chick Martin (semejante al anterior), el método de Kelsey y Sickes y el método de Kelsey y Maurer, que son de los más utilizados.⁴

El método de la AOAC para la evaluación de la eficacia bactericida de desinfectantes, nos ayuda a determinar las diluciones adecuadas de uso, y los tiempos de exposición necesarios con el propósito de evaluar la eficacia de desinfectantes comerciales utilizados en industrias farmacéuticas, donde se requiera un alto grado de limpieza.

⁴ Valoración de desinfectantes http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bprincipal.htm

I. MARCO TEORICO

Los agentes químicos antimicrobianos son compuestos que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos. Estos incluyen sustancias usadas como conservadores y antisépticos así como las usadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas de plantas y animales.

A. *Tipo de agente químico antimicrobiano:*

Antisépticos

Agentes microbicidas que pueden aplicarse sobre la piel y mucosas pero no pueden ser utilizados internamente. Ejemplos: mercuriales, nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes, detergentes.

Desinfectantes

Agentes que matan microorganismos pero no necesariamente sus esporas y no deben aplicarse sobre tejidos sino sobre objetos inanimados como mesas, pisos, utensilios, etc. Ejemplos: cloro, hipoclorito, compuestos clorados, soda, sulfato de cobre, compuestos de amonio cuaternario, etc.

Nota: Los desinfectantes y antisépticos se distinguen en base a si pueden o no ser usados de forma segura sobre membranas mucosas. Muchas veces esta seguridad depende de la concentración del agente. Por ejemplo, el cloro es agregado en concentraciones seguras en el agua potable.

B. *Mecanismo de Acción*

En la siguiente tabla se expone los desinfectantes y antisépticos más comunes con sus mecanismos de acción sobre los microorganismos y sus aplicaciones.

Tabla I. Desinfectantes y antisépticos más comunes.⁵

Agente químico	Acción	Usos
Etanol (50-70%)	Altera y precipita las proteínas del microorganismo.	Antiséptico de aplicación tópica
Isopropanol (50-70%)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico de aplicación tópica
Formaldehído (8%)	Reacciona con grupos-NH ₂ , -SH y -COOH	Desinfectante, mata endosporas
Tintura de yodo(2% I ₂ en 70% alcohol)	Inactiva proteínas	Antiséptico usado en piel
Cloro (Cl₂) gas o derivados como Hipoclorito de Sodio (lavandina)	Forma ácido hipocloroso (HClO), un fuerte agente oxidante	Desinfección en general y en particular para agua potable
Nitrato de plata (AgNO ₃)	Precipita proteínas	Antiséptico general y usado en ojos de recién nacidos
Cloruro de mercurio o Timerosal	Inactiva proteínas por reacción con los grupos sulfuro	Desinfectante. En ocasiones usado como componente en antisépticos para piel
Detergentes (ej. amonios cuaternarios) Germekil, TEGO 51.	Ruptura de membranas celulares	Desinfectantes y antiséptico de piel
Compuestos fenólicos (ej. hexilresorcinol, hexaclorofenol)	Desnaturalizan proteínas y rompen las membranas celulares	Antisépticos a bajas concentraciones, desinfectantes a altas concentraciones
Oxido de etileno (gas)	Agente alquilante	Desinfectante usado para esterilizar objetos sensibles al calor como goma y plásticos

⁵ CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO mail.fq.edu.uy/~microbio/MGral/practico/tercerciclo.doc

C. *Clasificación de los 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:

1. **Desinfectantes de bajo nivel**

Pueden destruir la mayor parte de las formas vegetativas bacterianas, tanto grampositivas como gramnegativas, algunos virus con envoltura lipídica y hongos levaduriformes, pero no *Mycobacterium spp*, ni las esporas de bacterias.

Derivados de amonio cuaternario

a) *Compuestos de amonio cuaternario*

Tenemos como representantes a: cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridino, etilbencetonio, desarrollados en 1935, son principios activos que contienen como estructura básica al ión amonio NH_4 , donde cada uno de los hidrógenos está sustituido generalmente por radicales de tipo alquil y aril. Se presentan en forma de sales. Según diversas modificaciones moleculares de su estructura, dan lugar a diferentes generaciones.

Los compuestos de amonio cuaternario son generalmente incoloros, inodoros, no irritantes y desodorantes. También tienen una acción detergente y son buenos desinfectantes. Son solubles en agua y alcohol. La presencia de cualquier residuo proteico anula su efectividad.

Mecanismo de acción

Son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que desorganizan la disposición de las proteínas y fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo con el metabolismo energético y el transporte activo. Los derivados del amonio cuaternario son agentes activos catiónicos potentes, en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activos para eliminar bacterias grampositivas y gramnegativas, aunque éstas últimas en menor grado. Son bactericidas, fungicidas y virucidas, actuando sobre virus lipofílicos pero no sobre los

hidrófilos. No tiene acción sobre las micobacterias, ni son esporicidas

Los compuestos de amonio cuaternario denominados de segunda generación (cloruro de etilbencilo) y de tercera generación (cloruro de dodecildimetilamonio) son compuestos que permanecen más activos en presencia de agua dura.

Tego 51= Dodecil (diamino etil) glicina).⁶

Germekil.- (cloruro de N-alkil-bencil amonio, cloruro de alkil dimetilamonio)

Compuesto de amonio cuaternario que une irreversiblemente a los fosfolípidos y proteínas deteriorando la permeabilidad, Desinfectante de nivel bajo.⁷

b) Compuestos mercuriales, “Timerosal”

Es un compuesto mercurial con características de unión, presenta gran acción bacteriostática y fungicida y en concentraciones mayores a 0.004% presenta reacciones alérgicas en porcentajes medios, estas reacciones no siempre son inmediatas, pueden ser retardadas en tiempo de uno o varios meses.

Los antisépticos mercuriales tienen una acción esencialmente bacteriostática y fungistática, pero de escasa potencia, que se debe a la acción precipitante de las proteínas presentes en el protoplasma bacteriano, al combinarse con los grupos sulfidrilos (SH-). Su espectro de acción es más pronunciado sobre las bacterias grampositivas que sobre las bacterias gramnegativas, además tiene acción sobre el *Pityrosporum ovale*.

Los compuestos inorgánicos que se han empleado son el bicloruro de Hg, óxido de Hg, precipitado blanco de Hg, borato de fenilmercurio, mercurio amoniaco, mercromina, **timerosal** y merbromin. Los compuestos

⁶ Especificaciones TEGO 51 <http://www.conexco.com.ar/producto.htm>

⁷ Especificaciones GERMEKIL. Especificaciones del Proveedor

inorgánicos del mercurio (como el mercuriocromo, la mercromina, el timerosal) no son totalmente fiables como desinfectantes y presentan cierta toxicidad, pero se emplean mucho como antisépticos de la piel y de heridas.⁸

2. Desinfectantes de nivel intermedio

Consiguen inactivar todas las formas bacterianas vegetativas, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, la mayoría de los virus con o sin envoltura y hongos filamentosos, pero no destruyen necesariamente las esporas bacterianas.

Los compuestos que pertenecen a este grupo son:

- Compuestos clorados
- Compuestos yodados
- Compuestos fenólicos
- Clorhexidina

a) *Compuestos clorados. "Hipocloritos"*

Los hipocloritos son los desinfectantes más utilizados de los derivados clorados y están disponibles comercialmente en forma líquida (hipoclorito de sodio) o sólida (hipoclorito cálcico, dicloroisocianurato sódico).

El mecanismo de acción sobre los microorganismos es poco conocido, pero se postula que actúan inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas.

Los hipocloritos tienen un extenso espectro de actividad, son bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, pero actividad variable frente a micobacterias, según la concentración en que se use.

Las soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl al 2% y al 5%) son

⁸ EDUCACIÓN CONTINUADA EN LENTES DE CONTACTO ES LA SOLUCIÓN O EL PROBLEMA.
<http://www.franjapublicaciones.com/articulo/articles%20No/149.htm>

probablemente los compuestos liberadores de halógenos mejor conocidos y figuran entre los desinfectantes más antiguos. Son extremadamente efectivos frente a todo tipo de microorganismos, pero pierden gran parte de su actividad en presencia de materia orgánica.⁹

El hipoclorito de sodio se presenta en solución a una concentración de 5,25%. Para las desinfecciones, las diluciones en uso son entre 0,1% y 1%. Las ventajas de esta solución sobre los otros desinfectantes incluyen la baja toxicidad a concentraciones de uso, la facilidad de manejo y el costo relativamente bajo. Las soluciones concentradas son corrosivas para la piel, metales y otros materiales.¹⁰

b) Alcoholes

Los alcoholes (etanol o alcohol etílico, alcohol isopropílico son compuestos orgánicos del agua, conocidos desde la antigüedad, y usados en medicina como antisépticos de limpieza y desinfección de heridas. Además de la actividad antimicrobiana, son un buen solvente de otros productos, entre ellos muchos antisépticos y desinfectantes, potenciando su actividad.

Los alcoholes habitualmente usados son el alcohol etílico o etanol y el alcohol isopropílico. Las concentraciones varían entre el 70% y el 96% para el primero y entre el 70% y el 100% para el segundo. Aunque sus aplicaciones son idénticas, se suele usar habitualmente el etanol por ser el menos irritante.

Mecanismo de acción

Los alcoholes actúan destruyendo la membrana celular y desnaturalizando las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, ello se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias permitiendo así daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas, con la consiguiente interferencia con

⁹H Henao S. Actividad bactericida del Acido Hipocloroso. Departamento Microbiología.

¹⁰ Leonardo Sánchez-Saldaña¹; Eliana Sáenz Anduaga. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES

el metabolismo y lisis celular. Su acción es rápida, incluso desde los 15 segundos, aunque no tiene efecto persistente. Sus efectos biológicos de daño microbiano permanecen por varias horas.

Espectro de acción

Los alcoholes poseen una rápida acción y amplio espectro de actividad, actuando sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus (hepatitis B y VIH), pero no son esporicidas. Este efecto es reversible.

Debido a la falta de actividad esporicida, los alcoholes no son recomendados para esterilización, pero son ampliamente usados para desinfección de superficies o antisepsia de la piel. Bajas concentraciones pueden ser usadas como preservantes y para potenciar la actividad de otros biocidas.

En general, el alcohol isopropílico es considerado más efectivo contra las bacterias, y el etílico es más potente contra virus. Esto es dependiente de la concentración de ambos agentes activos. El etanol al 70% destruye alrededor del 90% de las bacterias cutáneas en dos minutos, siempre que la piel se mantenga en contacto con el alcohol sin secarlo. Los alcoholes se inactivan en presencia de materia orgánica¹¹

3. Desinfectantes de alto nivel

Consiguen destruir todos los microorganismos, excepto algunas esporas bacterianas.

- Oxido de etileno
- Formaldehido
- Glutaraldehido
- Peroxido de Hidrogeno
- Acido peracético¹²

¹¹ Ídem 8

¹² Guía institucional para uso de antisépticos y desinfectantes. 2005, <http://www.info.ccss.cr/germed/gestamb/samb08d2.htm>

D. Factores que afectan la potencia de los antisépticos y desinfectantes

La acción de desinfectantes y antisépticos depende de varios factores, entre ellos:

- La concentración del agente químico y tiempo de exposición
- pH
- La temperatura.
- Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana.
- La clase de microorganismos presente.
- El número de microorganismos presentes.
- La naturaleza de material que acompaña a los microorganismos (materia orgánica, etc.)

El mejor resultado se obtiene cuando el número inicial de microorganismos es bajo y la superficie a ser desinfectada es limpia y libre de sustancias que interfieran.

1. Concentración del agente y tiempo de exposición

Existe una estrecha correlación entre la concentración del agente y el tiempo necesario para matar una determinada fracción de la población bacteriana. Si se modifica la concentración se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto. Un ejemplo es con los fenoles: un pequeño cambio en la concentración provoca cambios muy acentuados en el tiempo para lograr un mismo efecto, así, si reducimos la concentración de fenol desde un valor dado a la mitad, necesitamos emplear 64 veces más tiempo para conseguir matar una misma proporción de bacterias. Refiriéndonos al tiempo, no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente.

2. pH

Afecta tanto la carga superficial neta de la bacteria como el grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto son más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos; los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos.

3. Temperatura

Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes el aumento en 10° C supone duplicar la tasa de muerte.

4. Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana.

Según la especie, fase de cultivo, presencia de cápsula o de esporas y número de microorganismos se afecta la potencia. El bacilo tuberculoso suele resistir a los hipocloritos mejor que otras bacterias. La presencia de cápsula o esporas suelen conferir más resistencia.

5. La naturaleza de material que acompaña a los microorganismos (materia orgánica, etc.)

La presencia de materia orgánica como sangre, suero o pus afecta negativamente la potencia de los antisépticos y desinfectantes de tipo oxidantes, como los hipocloritos y de tipo desnaturalizante de proteínas, hasta el punto de hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante y/o esterilizante.¹³

E. Características y propiedades de un desinfectante ideal

Un desinfectante ideal reúne las siguientes características
 Amplio espectro: inactiva bacterias (Gram. positivas, Gram. negativas, micobacterias), virus, hongos, esporas.

¹³ Manual de Desinfectantes <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema07.pdf>

- Elevada potencia microbicida
- Acción rápida y sostenida
- No inactivado por materia orgánica
- Compatible con detergentes
- Estable a la concentración y dilución recomendadas
- No tóxico
- No potencial alergénico
- No corrosivo (compatible con cualquier material)
- Fácil de preparar y de usar
- Inodoro o de olor agradable
- Tensión superficial baja
- Con efecto residual
- Económico (buena relación coste/eficacia)
- No dañino para el medio ambiente

No existe en el mercado un desinfectante que cumpla todas estas características. Se escoge uno u otro en función del tipo de microorganismos que queremos eliminar, del material sobre el que se apliquen, la temperatura y el pH de trabajo, el tiempo de actuación, la presencia de materia orgánica sobre el material a desinfectar, etc.¹⁴

F. Rotación de los desinfectantes

Una posible solución a los fenómenos adaptativos es la rotación entre distintos desinfectantes. En esencia, esta práctica conlleva que, cada cierto tiempo, dependiendo de la empresa, el tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de desinfectante creando un ciclo con dos, y preferiblemente tres, productos de desinfección diferentes.

No obstante, se ha detectado en los últimos años un problema añadido, y por lo que parece, de cierta envergadura. Se trata de la aparición de fenómenos de

¹⁴ Características de un desinfectante ideal <http://www.academia.cat/societats/farmcl/l libre/higiene/332.pdf>

adaptación cruzada entre diferentes desinfectantes, el cual incrementa la supervivencia de los microorganismos. Ésta adaptación cruzada no parece deberse a respuestas genéticas específicas, sino a cambios celulares inespecíficos.

Actualmente hay poca información sobre cómo este tipo de respuestas pueden afectar a la rotación. En cualquier caso, este sistema de desinfección continúa siendo el que mejor respuesta ofrece para evitar la formación de biofilms, progresiones de los mismos e incrementos significativos en los peligros alimentarios.¹⁵

G. Efectos del mal uso de los desinfectantes

El poder desinfectante de un producto difiere entre cepas adaptadas y persistentes en las superficies con respecto a las no adaptadas. Esta situación es especialmente evidente en el caso de *Listeria monocytogenes* en relación con los amonios cuaternarios y las alquilaminas terciarias. Estudios recientes han demostrado que tras una exposición subletal de 2 horas, la concentración necesaria para destruir a este tipo de bacteria se incrementa en 3 veces.

En consecuencia, aunque los tiempos de contacto sean breves, los desinfectantes a concentraciones subletales o a tiempos insuficientes provocan cambios en las estructuras celulares que conllevan respuestas de tipo adaptativo. Por tanto, en la medida que el tratamiento de higienización sea insuficiente en tiempo por las prisas en terminar con la limpieza, o cuando la dosificación de los productos a emplear sea también insuficiente, por un intento de reducir costes o porque los equipos empleados no sean los adecuados, no sólo se dará una reducción en la eficacia desinfectante, sino que además se facilitará la adaptación de los microorganismos a situaciones que incrementarán el peligro de la presencia de patógenos.

¹⁵ JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ Resistencia y adaptación de patógenos a desinfectantes
www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/03/26/5687.php

Del mismo modo, se han observado otros problemas ligados a las cepas adaptadas a la presencia de concentraciones subletales de desinfectantes. La principal es que la mayor resistencia se evidencia no sólo respecto a un desinfectante, sino contra todos los productos con el mismo modo de acción. En paralelo, se reduce el tiempo necesario para la formación de biofilms en las superficies. Sumando el efecto adaptativo a la formación de estas películas en las superficies, el efecto de supervivencia se incrementa aún más.

La única recomendación posible es un buen empleo de los desinfectantes, a concentraciones adecuadas y en las condiciones que indique el fabricante. En este sentido, es igualmente recomendable no diluir excesivamente los productos químicos y dejarlos actuar el tiempo necesario, así como no utilizar siempre el mismo desinfectante, sino ir cambiando periódicamente con el fin de evitar que se produzcan fenómenos adaptativos cruzados entre sustancias que, siendo diferentes, tengan el mismo principio de acción.¹⁶

H. Evaluación de la eficacia Bactericida de los desinfectantes

Es posible evaluar la eficacia de los desinfectantes y antisépticos por medio de ensayos “*in vitro*” o de ensayos “*in use*”. Los ensayos “*in vitro*” se realizan en condiciones de laboratorio artificiales y controladas mientras los ensayos “*in use*” se realizan en las condiciones de uso.

Existen muchos y variados métodos para la evaluación de un agente químico. Estos métodos se clasifican según el tipo de microorganismo ensayado, según su acción (bactericida, bacteriostático, etc.), de acuerdo al objetivo (ensayos preliminares, de screening, determinación de la concentración óptima para un dado uso etc.), ensayos cuantitativos, etc. También existen normas en distintos países: AFNOR (Francia), AOAC (USA), DGHM (Alemania), etc. cuyos ensayos tienen validez siempre que se sigan

¹⁶ Ídem 12

estrictamente las condiciones especificadas.

El test de Chambers considera como buen desinfectante un producto que, a la concentración recomendada, cause un 99.9996% de muerte a una cantidad entre $7,5 \times 10^7$ y $1,3 \times 10^8$ células/ml en 30 segundos.

1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de la actividad bacteriostática es realizada por la CMI, mediante una serie de diluciones decrecientes del desinfectante en caldo nutriente, e inoculando los tubos con una solución bacteriana. Tras la incubación a 37° durante 24 horas se observa cual es la mínima concentración del producto que inhibe el crecimiento

Prueba de dilución seriada del desinfectante.

- Prueba semicuantitativa.
- Determina la mínima dilución capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

2. Test de Ridel Walter

El método de Ridel Walter compara la eficacia del desinfectante con la del fenol, mediante diluciones en tubo de ambos compuestos y determinando la dilución que es capaz de matar una cepa bacteriana en 7,5 minutos no en 5 minutos, tras el cultivo a 37° C durante 48 horas; si el coeficiente letal del fenol es, por ejemplo 1/80 y el de la sustancia problema, de 1/240, el coeficiente fenólico será $240/80 = 3$. Cuanto más alto sea el Coef. Fenólico mejor es la efectividad bactericida.¹⁷

3. Test de Kelsey-Sykes (test de capacidad)

Los test de capacidad sirven para determinar si un compuesto conserva su actividad después de realizar varias adiciones de suspensiones bacterianas. Pueden determinar la presencia o ausencia de crecimiento (Test de Kelsey y Sykes, o su modificación de Bergan-

¹⁷ PREGUNTAS SOBRE DESINFECTANTES. www.coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bpreguntas.htm

Lystad) o realizar un recuento de las bacterias supervivientes (test de Dony-Develeeschower).

4. Prueba de Kelsey y Maurer

Basado en determinar la eficacia de un desinfectante. El test “*in use*”, intenta la comprobación de la eficacia del desinfectante en las condiciones reales de uso, comprueba la observación o no del crecimiento de colonias tras la siembra en placas de agar de una dilución del inóculo de bacterias en el desinfectante.

5. Determinación de la Viabilidad

Se utiliza este procedimiento para verificar la viabilidad de la cepa en estudio además para conocer cuantas UFC (unidades formadoras de colonia) se enfrentan al desinfectante

6. Control de la Neutralización

Para comprobar que el neutralizante logra detener la acción del desinfectante. Los neutralizantes que inactivan desinfectantes deberían incluirse ya sea en el diluyente o los medios microbianos usados en el recuento microbiano o en ambos. (Ver tabla II).¹⁸

Tabla II. Agentes Neutralizantes para Agentes Comunes

Desinfectante	Agente Neutralizante
Alcoholes	Dilución o polisorbato 80
Glutaraldehido	Glicina y bisulfito de sodio
Hipoclorito de Sodio	Tiosulfato de Sodio
Clorhexidina	Polisorbato 80 y lecitina
Cloruro mercúrico y otros mercuriales	Ácido tioglicólico
Compuestos de amonio cuaternario	Polisorbato 80 y lecitina
Compuestos fenólicos	Dilución o polisorbato 80 y lecitina

¹⁸ Ídem 2. Pág. 557

7. Control de toxicidad del Neutralizante

Para comprobar que el neutralizante no sea tóxico para las bacterias, se realiza la determinación de la eficacia del neutralizante, sin afectar la recuperación de microorganismos viables (Toxicidad del neutralizante).¹⁹

8. Métodos de análisis de la AOAC

Son métodos establecidos por la Asociación Oficial de Análisis Químicos de Estados Unidos, que establecen metodologías para la evaluación de la actividad de los desinfectantes, antibióticos, pesticidas y otros.²⁰ Entre las metodologías que se pueden considerar útiles, en la evaluación de la efectividad de los desinfectantes, podemos mencionar las siguientes:

- Evaluación de la actividad en bacterias
- Evaluación de la actividad en Micobacterias
- Evaluación de la actividad en hongos
- Evaluación de la actividad en virus.
- Evaluación de la actividad de desinfectantes en aerosol.
- Evaluación de la actividad de desinfectantes en superficies (Prueba de transportadores)
- Los test prácticos, difícilmente estandarizables, se utilizan para verificar si una dilución en uso, que previamente se haya utilizado in-vitro es adecuada o no.

Las bacterias más utilizadas para los diferentes métodos de valoración de desinfectantes suelen pertenecer a colecciones internacionales y son las más usuales en el medio ambiente: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. faecalis*, *P. vulgaris*, etc.

¹⁹ Bello T, Rivero I., H de Waard J. Inactivación de micobacterias con Desinfectantes Registrados como Tuberculicidas. Laboratorio de tuberculosis Inst. de biomedicina. Caracas.

²⁰ Medrano A. Efectividad de los Desinfectantes y Antisépticos Intrahospitalario. Instituto Nacional del Tórax

II. JUSTIFICACIÓN

La problemática existente en la industria farmacéutica frente al control de la contaminación ocasionada por los microorganismos, relacionado al uso y manejo de los antisépticos, desinfectantes y la elección de los más apropiados, es necesario determinar las concentraciones mínimas de trabajo y tiempos de exposición adecuados que tengan un efecto desinfectante eficaz.

La capacidad de los microorganismos de adquirir resistencia a agentes bactericidas o bacteriostáticos como los antibióticos o los desinfectantes químicos es muy grande. A pesar que existen una gran variedad de productos químicos de limpieza pocos son utilizados como desinfectantes, debido a sus propiedades físicas y químicas, su acción no es solo suficientemente amplia para eliminar a todos los microorganismos.

No todas las bacterias son igualmente susceptibles a una concentración de desinfectante, incluso diferentes cepas de una misma especie pueden variar en su resistencia, por lo que es de interés común estudiar la efectividad o susceptibilidad con la utilización de métodos que determinen también la resistencia y la ineficacia variada de estos agentes químicos a diferentes concentraciones como indica el fabricante.

La finalidad de este trabajo es evaluar la actividad bactericida de un grupo de desinfectantes disponibles en el mercado boliviano. Los resultados y conclusiones obtenidos en el estudio nos permitirán la utilización de los desinfectantes y antisépticos con mayor conocimiento de los mismos.

En Bolivia no existen normas oficiales para evaluar los desinfectantes por lo cual se utiliza diferentes pruebas como las de Kelsey y Maurer, Kelsey y Sikes, AOAC y otros, estandarizados como métodos de evaluación a nivel internacional. Un método establecido como referencia internacional es la de la A.O.A.C. porque es una técnica aplicable a las condiciones requeridas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los desinfectantes y antisépticos son sustancias químicas que tienen como fin destruir los microorganismos patógenos y no patógenos causantes de la contaminación en ambientes de fabricación y productos en una planta farmacéutica.

Sabiendo la dificultad de establecer el grado de efectividad, de un agente desinfectante. Se deben establecer los criterios adecuados para desinfectantes ideales, y establecer un sistema de evaluación de los mismos. En consecuencia, debe seleccionarse el o los desinfectantes que resulten más convenientes, como resultado del proceso de evaluación.

Un caso crítico, es la fabricación de líquidos y sólidos estériles que presentan requerimientos ambientales y de limpieza muy exigentes; de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura. Con objeto de evitar efectos nocivos de los microorganismos, es necesario disponer métodos que permitan eliminarlos, de manera que, podamos disponer de ambientes limpios sin contaminación microbiana.

IV. OBJETIVOS

A. *Objetivo General.*

- Evaluar el efecto bactericida de los desinfectantes en cepas bacterianas ATCC y cepas aisladas del área de fabricación de productos estériles, realizando las pruebas de dilución “*in use*” (AOAC Modificado), en condiciones controladas del tiempo de acción y concentración del desinfectante en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A.

B. *Objetivos Específicos.*

- Establecer los neutralizantes y concentraciones adecuados para los diferentes tipos de desinfectantes.
- Establecer la toxicidad del neutralizante para los diferentes tipos de bacteria.
- Verificar que las concentraciones de trabajo y tiempos de exposición de los desinfectantes aplicados en ambientes de fabricación son eficaces.
- Determinar la concentración de trabajo requerida y el tiempo de exposición óptimo para cada desinfectante, necesario para:
 - Establecer la concentración óptima en la cual se obtiene una efectividad bactericida igual o superior al 99.9996 %.
 - Establecer el tiempo de exposición óptimo requerido para obtener una buena desinfección de los ambientes.
- Determinar los desinfectantes que presentan la mayor eficacia bactericida con respecto a la concentración y al tiempo de exposición.
- Determinar que microorganismo es más resistente al ataque de los desinfectantes.

V. FORMULACIÓN DE LAS HIPOTESIS

A. *Hipótesis General*

El método de evaluación de la actividad bactericida; para los desinfectantes utilizados en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A., es la prueba de dilución “*in use*” (según USP 30), utilizando volúmenes iguales de desinfectante y muestra.

B. *Hipótesis Específica*

- ✓ Las concentraciones y tiempos de exposición de los desinfectantes son eficaces en los ambientes de fabricación.
- ✓ Los desinfectantes utilizados en laboratorios BAGÓ de Bolivia presentan una efectividad superior al 99.9996% a las diluciones utilizadas en los ambientes y a un tiempo de exposición inferior a 20 minutos.
- ✓ La lavandina por sus características químicas, presenta una velocidad de muerte rápida inferior a 5 minutos, y actúa incluso eliminando *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias Gram negativas.
- ✓ Los neutralizantes puestos a prueba neutralizan a los desinfectantes.
- ✓ Los neutralizantes puestos a prueba no son tóxicos para las bacterias.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO

A. Descripción del Ámbito en Estudio

Desinfectantes utilizados para la limpieza y desinfección de los ambientes de fabricación (líquidos estériles), evaluando su efectividad bactericida a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A.

B. Ámbito de Investigación

Lugar: Laboratorios BAGÓ de Bolivia S.A.,
Área de Fabricación de productos estériles

Sector: Investigación Microbiológica

Ambiente de trabajo: Laboratorio de Microbiología II.

C. Microorganismos

- ✓ Cepas bacterianas ATCC: Cepas estándar procedentes de una colección internacional.
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 35218
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Cepas aisladas de los ambientes de fabricación de líquidos estériles. Laboratorios Bagó de Bolivia S.A.:

- ✓ *Staphylococcus spp*
- ✓ *Micrococcus spp* (aislado en Agosto 2005)
- ✓ *Micrococcus spp.*(aislado en Julio 2007)

VII. MATERIALES Y METODOS

A. *Materiales, Reactivos y Medios*

- Materiales de protección (gorro, barbijo, guantes)
- Mechero Bunsen
- Fósforo
- Tubos de ensayo
- Frasco grande para desinfectante
- Cronometro
- Erlenmeyer
- Ansas bacteriológicas
- Gradilla
- Tips
- Propipeta
- Tubos Vacutainer con tapones
- Micropipetas
- Pipetas
- Tubos para lectura en espectrofotómetro
- Gradilla para tubos de espectrofotómetro
- Tiras de parafilm
- Marcador indeleble
- Papel cebolla y mantequilla
- Placas petri
- 1 Piseta

Reactivos y Medios

- Solución de hipoclorito de sodio 0.9%
- Algodón empapado en alcohol al 70%
- Solución fisiológica (Cloruro de Sodio)
- Agua estéril
- Agar nutritivo

- Tiosulfato de Sodio 0.8%
- Tioglicolato 5%

Equipos

- Refrigerador
- Vortex
- Espectrofotómetro
- Estufa a 37°C

B. Metodología

Para comprobar la efectividad de los desinfectantes y antisépticos se utiliza el método de dilución “*in use*” (Prueba de la AOAC modificado)²¹ para la evaluación de la actividad bactericida. Sobre los desinfectantes utilizados en Laboratorios BAGO de Bolivia S.A.

Se trabajó sobre:

- ✓ GERMEKIL
- ✓ TIMEROSAL
- ✓ TEGO 51
- ✓ LAVANDINA
- ✓ ALCOHOL

Se evalúa la efectividad bactericida porcentual del desinfectante; variando la concentración de trabajo (independiente para cada desinfectante) y el tiempo de exposición (se toma 4 puntos: 2, 5, 10, 15, 20 minutos).

C. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo, se realiza, después de incubar el microorganismo de ensayo en medio enriquecido después de 24 horas.

²¹ “Desinfectantes y antisépticos”<1072> USP 30 Versión en español. Pág. 557

Se resuspende al microorganismo en suero fisiológico estéril determinando la concentración de la suspensión con un espectrofotómetro. La transmitancia de la suspensión bacteriana debe ser de un 50% a una longitud de onda de 630 nm, que corresponde a una suspensión bacteriana con concentración de 3×10^8 UFC/ml.

D. Prueba de viabilidad

Se realiza esta prueba para determinar experimentalmente el número inicial de microorganismos que serán enfrentados con el desinfectante, esta prueba se realiza realizando 5 diluciones seriadas 1/10 de la solución madre de 3×10^8 ufc/ml (valor teórico) y sembrando una alícuota de la última dilución en agar nutritivo a 37 °C durante 18 a 24 horas, con el conteo obtenido se determina la concentración real de los microorganismos utilizados como inóculo.

E. Control de Neutralización del Desinfectante

Para comprobar que el neutralizante logra detener la acción del desinfectante se mezcla un volumen del desinfectante con el volumen adecuado del neutralizante.

Añadir 100 ul del inóculo bacteriano, mezclar, y sembrar 100 ul de la mezcla en placas de agar nutritivo.

Dejar incubar de 18 a 24 horas y realizar el conteo de colonias.

F. Control de Toxicidad del Neutralizante

Para comprobar que el neutralizante no es tóxico para las bacterias se enfrenta un volumen del inóculo bacteriano con un volumen del neutralizante.

Sembrar 100 uL de la mezcla en agar nutritivo.

Dejar incubar de 18 a 24 horas.,

G. Método

La determinación de la actividad antimicrobiana propiamente tal, se efectuó de acuerdo a la metodología recomendada por la AOAC, poniendo en contacto los

microorganismos en concentraciones de 10^8 ufc/ml con los productos en estudio, en volúmenes iguales (3ml microorganismo y 3 ml del desinfectante) sacando alícuotas de la suspensión de 100 ul. A los tiempos establecidos (2, 5, 10, 15 y 20 minutos) y efectuando el recuento de los microorganismos sobrevivientes.

Este recuento final y el recuento inicial de las cepas en la prueba de viabilidad, se realiza en Agar Nutritivo con incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 18 a 24 horas.

H. Procesamiento de la variable en estudio

Los datos obtenidos se recopilaran en una hoja de cálculo, ordenando todos los datos en tablas.

Las variables que son evaluadas son:

- Tiempo de exposición
- Concentración del desinfectante
- Tipo de desinfectante

Con los datos ya introducidos, se realizarán los gráficos comparativos de las variables obtenidas, respondiendo a las hipótesis planteadas.

1. Determinación de la Eficiencia Germicida Porcentual.

Determina el porcentaje de bacterias que mueren al contacto con el desinfectante.

Se realiza el cálculo mediante la siguiente formula:

$$\% E = \left(\frac{N_o - N_t}{N_o} \right) * 100$$

Donde:

N_o = Numero de microorganismos iniciales

N_t = Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t.

Ejemplo

Datos obtenidos:

Analista	Irma Mamani Urquizo		
Desinfectante.-	Lavandina	Cepa bacteriana:	Staphylococcus spp
Conc. de Trabajo.-	0,7%; 0,4% 0,08%	Inoculo:	100 uL
Neutralizante.-	Tiosulfato de Sodio 0,8%		

PORCENTAJE DE EFECTIVIDAD BACTERICIDA
BASE DE DATOS PARA RELLENAR

Viabilidad 1	65
--------------	----

TIEMPO (MINUTOS)	ENSAYO 1		
	CONCENTRACIÓN		
	0,70%	0,40%	0,08%
2	0	20	164
5	0	5	20
10	0	0	1
15	0	0	0
20	0	0	0

2. Determinación de No (Prueba de viabilidad)

$$No = \text{Nro. de UFC/placa (prueba de viabilidad)} \times Fd$$

Se realizan cinco diluciones seriadas 1/10 por lo que el factor de dilución es 1×10^5 .

Ejemplo

Viabilidad: 225 UFC
 Fd: 1×10^5
 Vol. de siembra: 100 uL o 0.1 mL.

225 UFC son las bacterias que crecieron de la siembra de un volumen de 100 uL, entonces necesitamos saber las UFC existentes en 1 mL de muestra.

$$\begin{array}{r} 225 \text{ UFC} \text{ ----- } 0.1 \text{ mL} \\ x \text{ UFC} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 2250 \text{ UFC}$$

Para determinar la cantidad inicial de microorganismos “No” se utiliza la siguiente formula:

$$N_0 = Fd * \text{Nro. UFC}$$

$$N_0 = 1 \cdot 10^5 * 2250 \text{UFC}$$

$$N_0 = 2.25 \cdot 10^8 \text{UFC}$$

El dato obtenido se reemplaza en la formula 1(1)

3. Determinación del “Nt ”

Es el número de bacteria sobrevivientes a un tiempo determinado.

Ejemplo

Conteo en placa: 164 UFC

Vol. De siembra: 100 uL o 0.1 mL

- 164 UFC son las bacterias que crecieron de la siembra de un volumen de 100 uL de la mezcla de desinfectante y bacteria.
- El volumen total de la mezcla es de 6 mL (3 mL del desinfectante A + 3 mL del inoculo bacteriano)
- Entonces tenemos:

$$\begin{array}{r} 164 \text{ UFC} \text{ ----- } 0.1 \text{ mL} \\ x \text{ UFC} \text{ ----- } 6 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 9840 \text{ UFC}$$

- El dato obtenido es el “Nt”, que se reemplaza en la formula 1(1)
- Con los datos obtenidos de No y Nt calculamos la Eficiencia Germicida Porcentual (%E) del siguiente modo:

DATOS

$$\begin{aligned} N_o &= 2.25 \times 10^8 \text{ UFC} \\ N_f &= 9840 \text{ UFC} \end{aligned}$$

$$\% E = \left(\frac{N_o - N_f}{N_o} \right) * 100$$

Reemplazamos.

$$\% E = \left(\frac{2.25 \cdot 10^8 - 9840}{2.25 \cdot 10^8} \right) * 100$$

$$\% E = 99.9956\%$$

- Entonces para el desinfectante A, a un tiempo de 30 segundos el %E es 99.9956%
- Calcular el %E para los conteos de las placas a los siguientes tiempos (1, 5, 10, 15, 20 minutos), y a las diferentes concentraciones de prueba.
- Las pruebas se realizan por triplicado y los resultados se promedian para obtener la siguiente tabla:

Analista			
Desinfectante.-	Lavandina	Cepa bacteriana:	Staphylococcus spp
Conc. de Trabajo.-	0,7%; 0,4% 0,08%	Inoculo:	100 uL
Neutralizante.-	Tiosulfato de Sodio 0,8%		

**PORCENTAJE DE EFECTIVIDAD BACTERICIDA
CUADRO DE EFECTIVIDAD BACTERICIDA VS TIEMPO DE
EXPOSICIÓN**

Viabilidad 1	225
No 1	2.25E+08

TIEMPO (MINUTOS)	ENSAYO 1		
	CONCENTRACIÓN		
	0,70%	0,40%	0,08%
2	100	99,9999	99.9956
5	100	99,9999	99,9994
10	100	100	99,9996
15	100	100	100
20	100	100	100

Nota.- Se consideran las concentraciones y tiempos óptimos aquellos superiores al 99.9996 % según lo estipulado según el Test de Chambers.

VIII. RESULTADOS

En este trabajo se han testado 5 desinfectantes: TEGO 51, Germekil, Timerosal, Lavandina y alcohol (ver foto N° 1), con el fin de determinar su eficacia. Se enfrentaron a 6 cepas: 3 cepas de referencia ATCC y 3 cepas aisladas del ambiente de fabricación: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp*, *Micrococcus spp* (2005 y 2007) realizando una serie de pruebas in Vitro establecidas según normas vigentes.²²

Podemos observar que no existe una diferencia importante entre las concentraciones utilizadas en la desinfección de áreas de fabricación de productos estériles, que eran utilizados antes del estudio realizado; con respecto a las concentraciones establecidas como óptimas y recomendadas para realizar la desinfección. (Tabla 1)

Tabla N° 1. Condiciones iniciales de trabajo, establecidas en áreas de fabricación de productos estériles, en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A. Gestión 2007.

DESINFECTANTES	CONDICIONES INICIALES DE TRABAJO	
	[C]	Tiempo exp.
TIMEROSAL	0.1 %	10 min
	0.04 %	10 min
LAVANDINA	0.4 %	No especificado
	0.08 %	No especificado
TEGO 51	1 %	10min
GERMEKIL	1/30	10 min
ALCOHOL	70 %	No especificado

* El alcohol no es recomendable para utilizarlo como desinfectante, sino como antiséptico.

²² “Desinfectantes y antisépticos”<1072> USP 30 Versión en español. Pág. 554

Para las pruebas que se realizaron, primero se seleccionó y se evaluó la capacidad neutralizante de determinados compuestos; para neutralizar la actividad de los desinfectantes utilizados. Se puede observar también que, se utiliza un mismo neutralizante para el GERMEKIL y el TEGO 51, por ser desinfectantes de la misma familia (Derivados de Amonio Cuaternario). (Ver Tabla N° 2)

Tabla N° 2 Características de los neutralizantes seleccionados y las concentraciones de trabajo seleccionadas con los ensayos de dilución “in use”. En Laboratorios Bagó de Bolivia S.A. Gestión 2007.

DESINFECTANTE	NEUTRALIZANTE BIBLIOGRAFIA		NEUTRALIZANTE ELEGIDO
TIMEROSAL	Acido Tioglicolico		<i>Tioglicolato de Sodio 8%</i>
	Neutralizante	Viabilidad	
	242	258	Recuperación 91.57 %
	258 x = 250	288 x = 273	Disminución 8.42%
LAVANDINA (Hipoclorito de sodio)	Tiosulfato de Sodio 0.6%		<i>Tiosulfato de sodio 0.8 %</i>
	Neutralizante	Viabilidad	
	262	258	Recuperación: 94.13 %
	252 x = 257	288 x = 273	Disminución: 5.86 %
TEGO 51 GERMEKIL	0.5 % Tween 80 / 0.7% Lecitina de soja		<i>2 % Tween 80 2.5 % Lecitina de soja</i>
	Neutralizante	Viabilidad	
	251	290	Recuperación: 91.58 %
	239 271 x = 254	271 279 x = 277	
ALCOHOL	Método por dilución en agua ½		<i>100 uL alcohol + 100 uL agua</i>
	Neutralizante	Viabilidad	
	262	288	Recuperación: 93.77 %
	250 x = 256	258 x = 273	Disminución: 6.2 %

En la evaluación de la toxicidad de los neutralizantes podemos observar que las concentraciones seleccionadas para cada neutralizante no generan la disminución de la viabilidad (toxicidad de la bacteria), en un porcentaje mayor al 25%, y son óptimas para realizar los ensayos.

Tabla N° 3. Resultados de la evaluación de la toxicidad de los 5 desinfectantes, expresado en términos de porcentaje de disminución de la población inicial (Ensayo de Toxicidad), obtenidos en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A. 2007.

DESINFECTANTE	VIABILIDAD	TOXICIDAD	% DISMINUCIÓN
TIMEROSAL	258 } 288 } 273	262 } 258 } 260	4.76 %
LAVANDINA	258 } 288 } 273	266 } 280 } 273	0.00 %
TEGO 51 GERMEKIL	272 } 280 } 251 } 268	241 } 255 } 261 } 252	5.97 %
ALCOHOL	258 } 288 } 273	280 } 232 } 271	0.73 %

Se realizaron las pruebas por triplicado y los datos obtenidos de los conteos en placa, se recopilaron en tablas. Estos datos posteriormente se utilizaron para obtener la eficiencia germicida porcentual.

Se realizó el promedio de los datos de las tablas anteriores, para obtener una tabla de concentración vs. tiempo de exposición, en términos de eficiencia germicida porcentual. Al realizar esto, se obtuvieron tablas para cada desinfectante y cada cepa bacteriana. (**Ver Anexo I**)

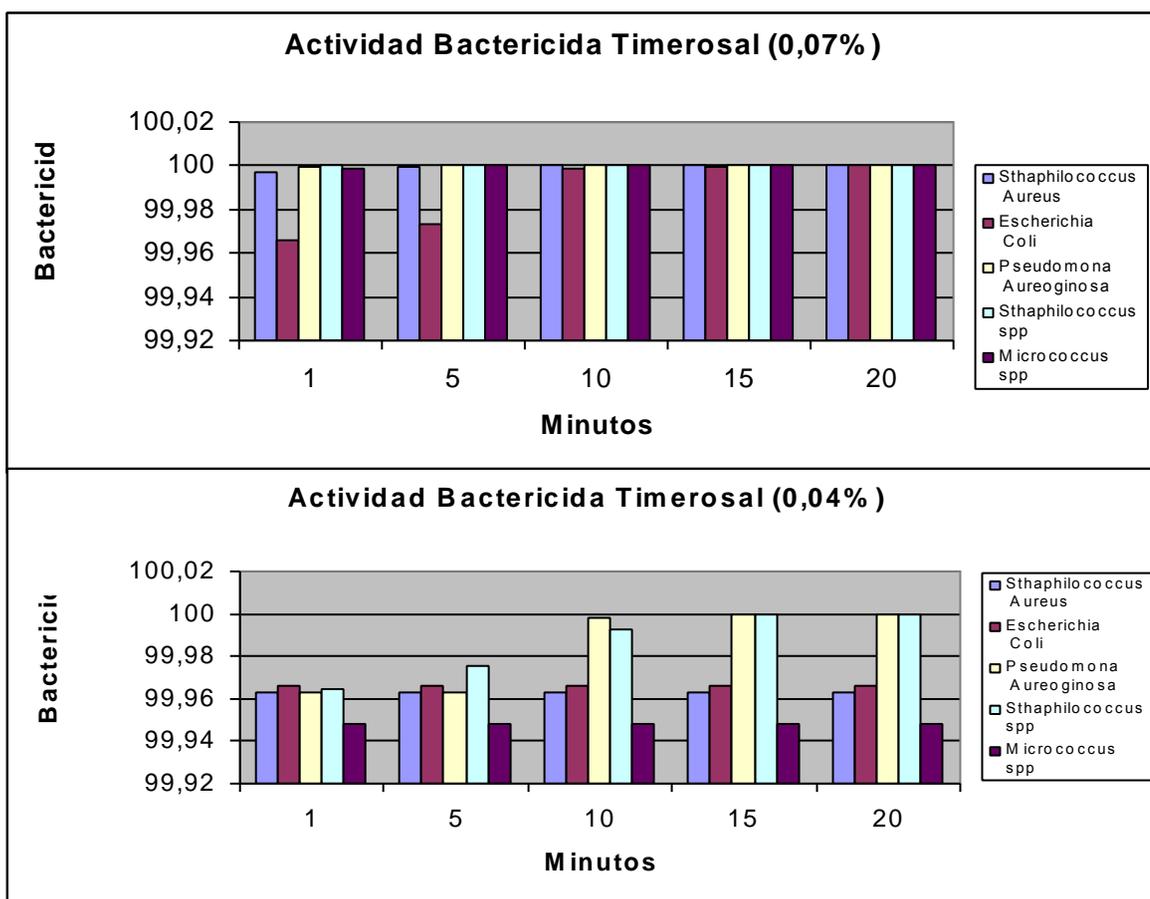
Ahora, con las tablas resumidas, generamos gráficos, donde se evalúa la actividad bactericida de cada desinfectante sobre cada bacteria, a las diferentes concentraciones de trabajo y a los tiempos de exposición establecidos.

A. TIMEROSAL

De acuerdo a los gráficos (**ver Anexo II, A**), se observa que el Timerosal (derivado mercurial), presenta una adecuada efectividad bactericida a las concentraciones superiores a 0.07 % y con tiempos de exposición superiores a los 10 minutos, también observamos que la concentración ensayada de 0,04 %

de Timerosal no presenta la efectividad requerida, observándose ineficiente hasta un tiempo superior a 20 minutos de exposición.

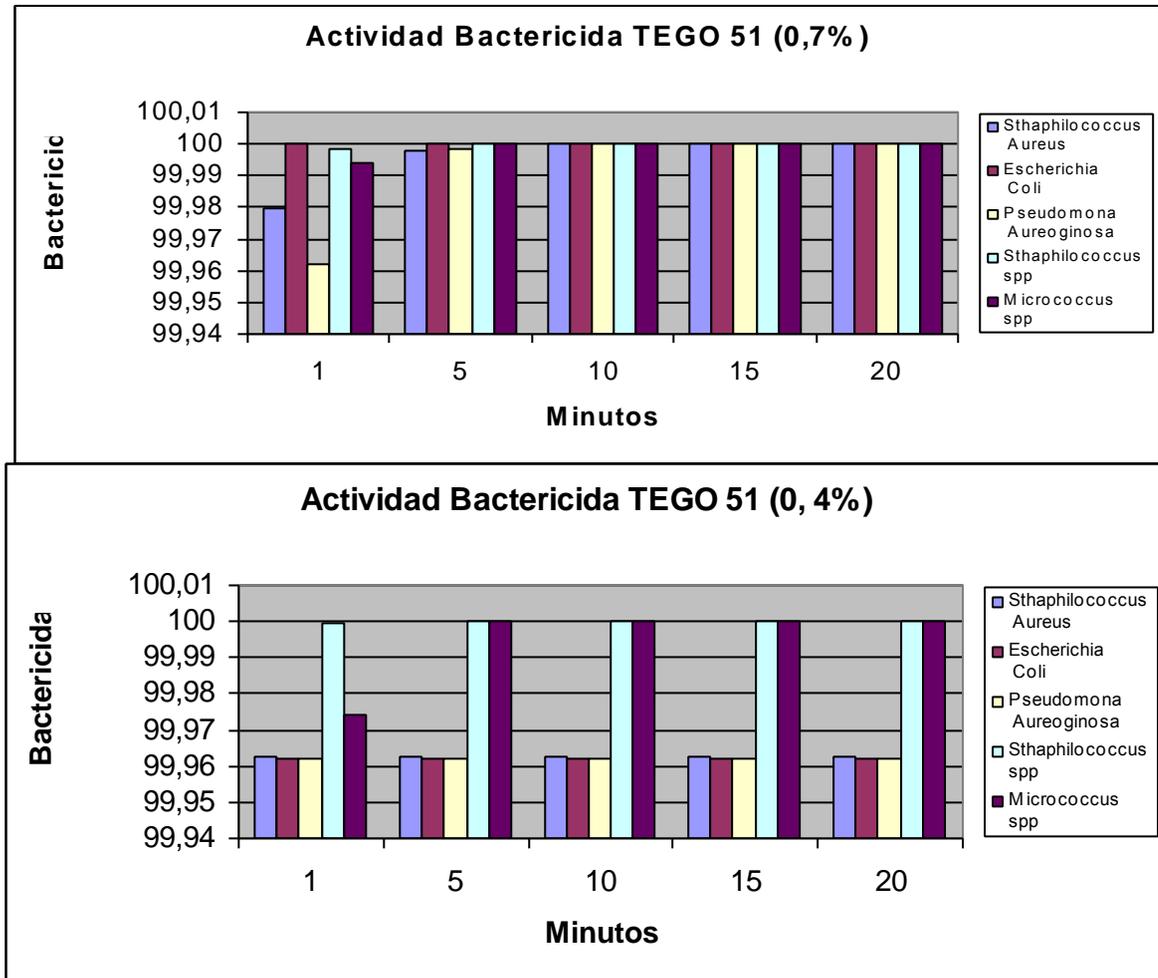
Grafica 1. Comparación de la acción bactericida del Timerosal sobre las cepas en estudio a concentraciones de 0.07 % y 0.04% a diferentes tiempos de exposición en Laboratorios Bag de Bolivia. Gestión 2007.



B. TEGO 51

El TEGO 51 (derivado de amonio cuaternario), se evidencia que hasta una concentración de 0,7 % y a un tiempo superior a 5 minutos de exposición al desinfectante llega a una eficacia del 99,99 %. También se observa que llegando a una concentración de 0,4 % la efectividad se encuentra disminuida, para tres de cinco cepas de ensayo. (Ver Anexo II, B)

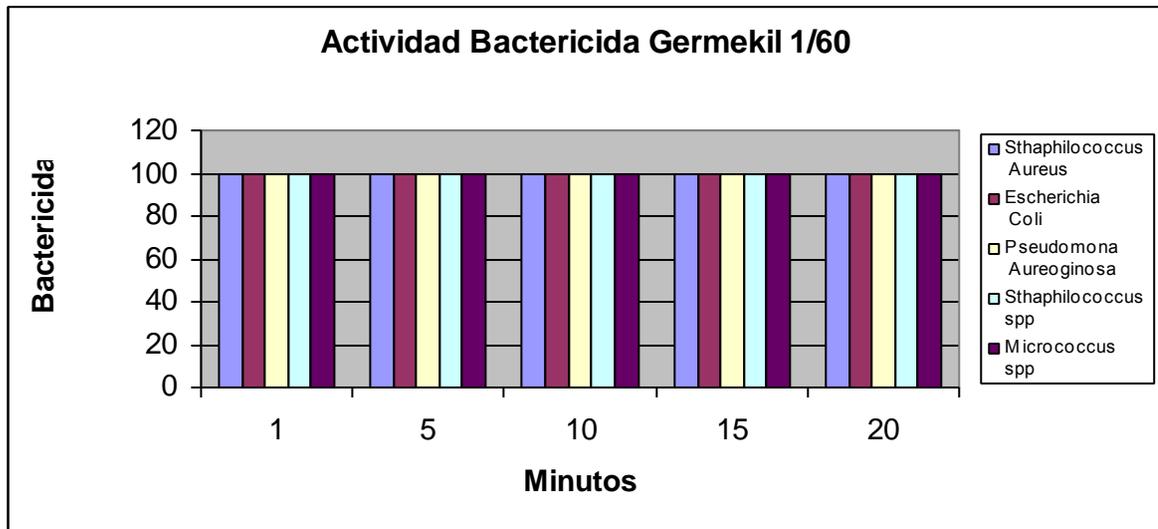
Grafico 2. Comparación de la acción bactericida del TEGO 51 sobre las cepas en estudio a concentraciones de 0.7 % y 0.4% a diferentes tiempos de exposición en Laboratorios Bagó de Bolivia. Gestión 2007.



C. GERMEKIL

Con el GERMEKIL (derivado de amonio cuaternario), se alcanza un 100 % de eficacia bactericida hasta una dilución de 1/60, y con un tiempo de exposición mayor a 1 minutos con todas las cepas de ensayo. Estos resultados nos muestran que el Germekil es un desinfectante recomendado para la limpieza y desinfección. (Ver Anexo II, C)

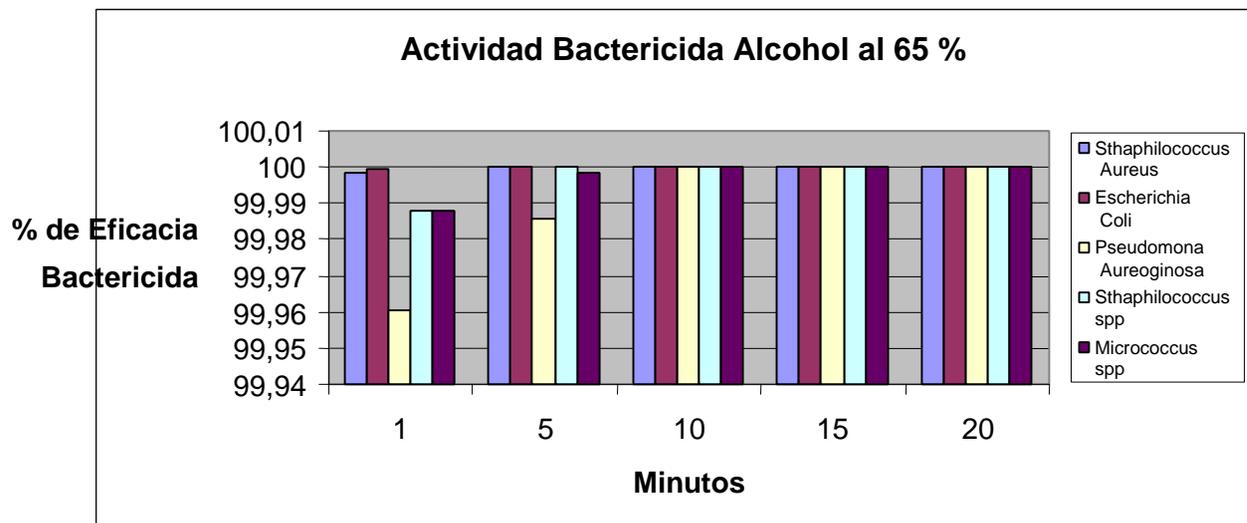
Gráfico 3. Acción bactericida del Germekil sobre las cepas en estudio a una dilución de 1/60 a diferentes tiempos de exposición en Laboratorios Bagó de Bolivia. Gestión 2007.



D. ALCOHOL

Los resultados obtenidos de los ensayos con el etanol comercial, evidencian una eficacia del 99,999 % a una concentración de 65% y un tiempo de exposición superior a los 10 minutos de exposición. Tomando en cuenta que las bacteria fueron expuestas directamente con un volumen determinado de desinfectante en solución. (Ver Anexo II, D)

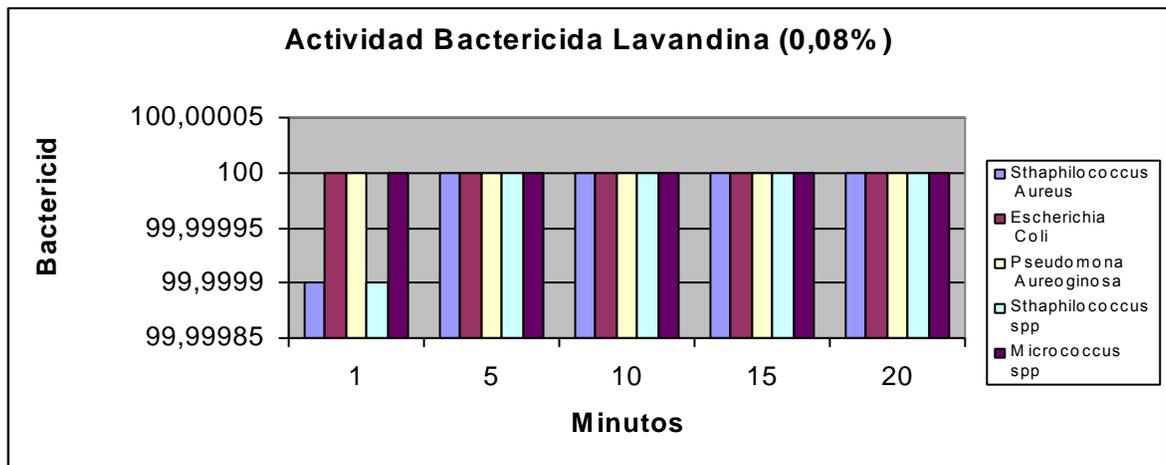
Gráfico 4. Acción bactericida del Alcohol al 65 % sobre las cepas en estudio a una concentración del 65 % a diferentes tiempos de exposición en Laboratorios Bagó de Bolivia. Gestión 2007.



E. LAVANDINA

El hipoclorito de sodio (derivado clorado), presenta una eficacia bactericida del 100 % a concentraciones superiores al 0,08 % a un tiempo superior a 1 minuto. También se lo considera eficaz para el trabajo, pero debe tomarse las precauciones necesarias para su manejo. (Ver Anexo II, E)

Grafico 5. Acción bactericida de la lavandina a una concentración de 0.08 % sobre las cepas en estudio a diferentes tiempos de exposición en Laboratorios Bagó de Bolivia. Gestión 2007.



A partir de los gráficos generados podemos resumir las concentraciones de trabajo, recomendadas para la desinfección de las áreas de fabricación, con los desinfectantes evaluados, determinando las concentraciones de trabajo efectivas y los tiempos de exposición. (Ver tabla 4)

Tabla N° 4. Condiciones iniciales de trabajo, y condiciones recomendadas para el uso de desinfectantes en áreas de fabricación de productos estériles. En Laboratorios Bagó de Bolivia S.A. Gestión 2007

DESINFECTANTES	CONDICIONES INICIALES DE TRABAJO		CONDICIONES RECOMENDADAS	
	[C]	Tiempo exp.	[C]	Tiempo exp.
TIMEROSAL	0.1 %	10 min	0.1, 0,07 %	> 10 min
	0.04 %	10 min		
LAVANDINA	0.4 %	No especificado	0.7, 0.4, 0.08 %	> 01 min
	0.08 %	No especificado		
TEGO 51	1 %	10min	1, 0.7 %	> 05 min
GERMEKIL	1/30	10 min	1/30, 1/40,1/60	> 01 min
ALCOHOL	70 %	No especificado	75%, 70%,65%	> 10 min

Después de determinar las concentraciones óptimas de trabajo y los tiempos de exposición a utilizarse para cada desinfectante evaluamos la posible tolerancia de las bacterias ATCC y las bacterias aisladas de los ambientes, al ataque de los desinfectantes.

Con las graficas realizadas (**Ver Anexo III**) se evidencia que:

A concentraciones altas de exposición las bacterias ensayadas, sufren una muerte del 100 % a tiempos de exposición que van desde 1 a 5 minutos. Para determinar que bacteria presenta mayor resistencia, se avaluó la eficacia bactericida de los desinfectantes a las concentraciones bajas de ensayo, obteniendo que:

La *Pseudomonas aeruginosa*, no alcanza a los 99,996 % de eficacia bactericida a un tiempo de 5 minutos, con tres de cinco desinfectantes. Siendo esta la única cepa que presenta supervivencia al ataque del TEGO 51, TIMEROSAL y ALCOHOL.

Las cepas aisladas del ambiente de fabricación son susceptibles al ataque de cuatro de cinco desinfectantes ensayados, observándose que el TIMEROSAL a una concentración de 0,04 %, resulta ineficaz para realizar la limpieza de acorde a los estudios in vitro.

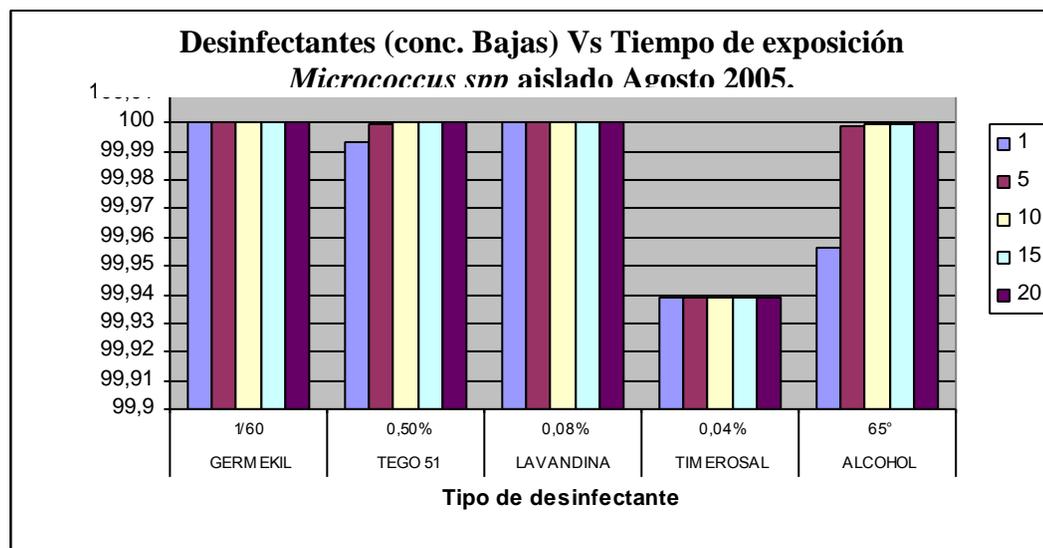
Se tomaron dos muestras de las cepas aisladas de *Micrococcus*:

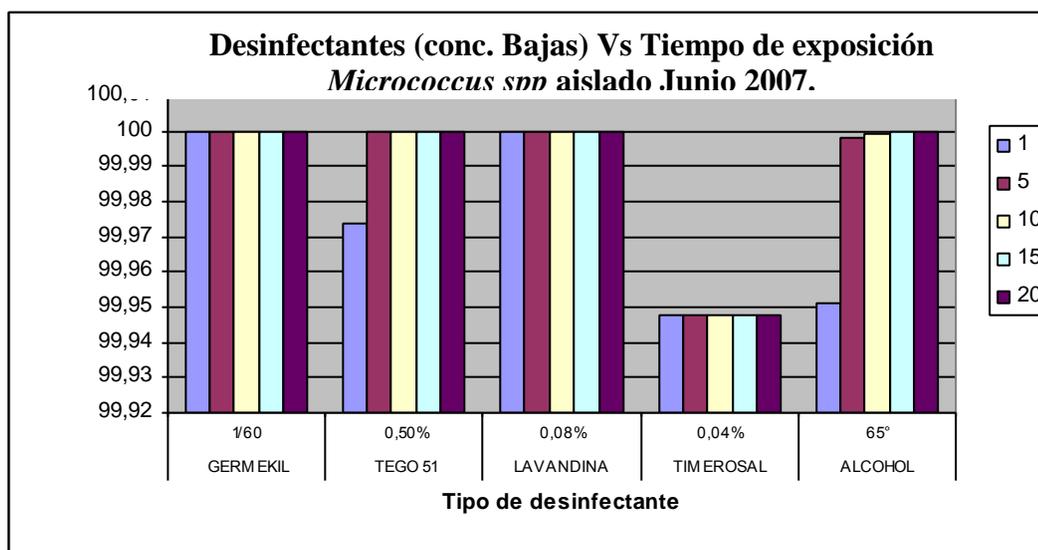
Cepa I; aislada en Agosto 2005

Cepa II; aislada en Junio 2007

Se comparó la efectividad de las dos cepas aisladas, tomando en cuenta como referencia las concentraciones bajas utilizadas para cada desinfectante, y resumidas en los gráficos anteriores. No se evidencia una notoria diferencia entre la efectividad de los desinfectantes sobre las dos cepas, por lo cual establecemos que no genero la tolerancia de esta cepa al ataque de los desinfectantes ensayados. (Ver anexo III: E,F)

Grafico 6. Comparación de la acción bactericida de los desinfectantes evaluados entre dos cepas de *Micrococcus spp* (Cepa 1: Agosto 2005, cepa 2: Junio 2007). A concentraciones bajas, en Laboratorios Bagó de Bolivia. Gestión 2007.





IX. DISCUSIÓN

Previo a cualquier evaluación de la eficacia bactericida de los desinfectantes, es necesario primero establecer el(los) neutralizante(s) a ser utilizados para las pruebas, Según la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR)²³, nosotros establecimos las concentraciones de trabajo a utilizarse para la neutralización de la acción de los desinfectantes de acuerdo a nuestro estudio (**Ver foto 1**). La USP 30 (Farmacopea estadounidense) establece concentraciones de trabajo y hasta caldos y agares de neutralización para este tipo de estudios²⁴.

FOTO Nº 1

Materiales utilizados en la prueba, como los neutralizantes y modo de orden en el trabajo realizado en Laboratorios Bagó de Bolivia S.A. Gestión 2007.



²³ Valoración de desinfectantes http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bprincipal.htm

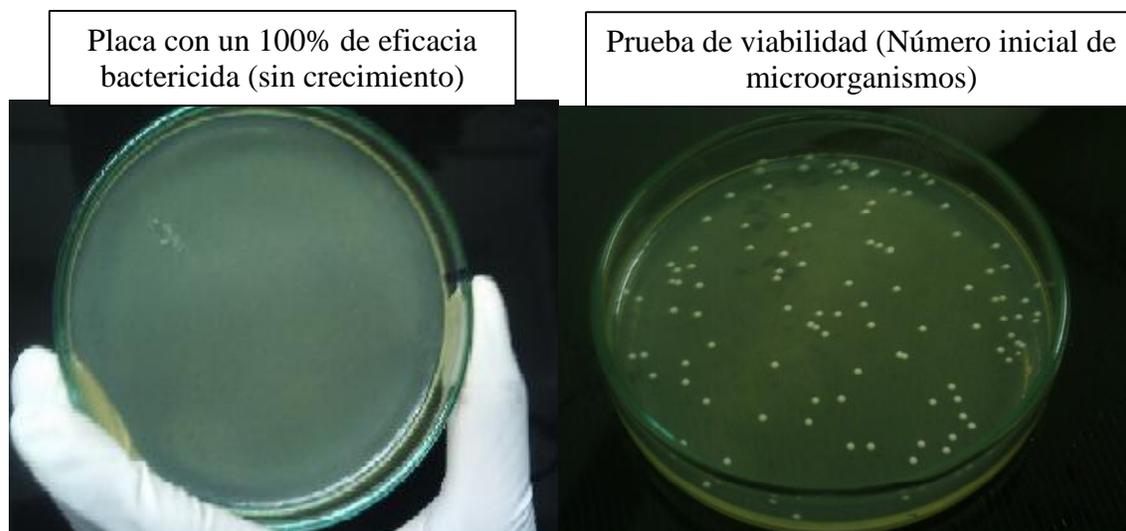
²⁴ "Validación de Métodos de Neutralización-Comparaciones de Recuperación" <1227> USP 30 Versión en español. Pag.753-756

Se obtuvo que la actividad antibacteriana de los desinfectantes estudiados depende del microorganismo sobre el que actúen, así como de la temperatura y del tiempo de acción son importantes. En el estudio se aprecia que *S. aureus* fue el microorganismo más sensible a los desinfectantes estudiados por ser una bacteria Gram positiva, y la exhibida por *Pseudomonas aeruginosa*, presenta mayor resistencia como sucede con el timerosal y el alcohol (**Ver ANEXO II A,D**). La resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* también se observa en trabajos similares, por Luís López y Romero 2002. Donde se observa la resistencia a la muerte de la *Pseudomonas* frente a desinfectantes utilizados en la industria de alimentos.²⁵

Podemos observar (Tabla 4), que la actividad Bactericida del Germekil, TEGO 51, Lavandina, Timerosal y el alcohol es óptima para la desinfección de los ambientes estériles de fabricación, hasta los 5 minutos de acción; ya que las cepas control y cepas aisladas sufrieron una reducción del 99.999% de acuerdo al limite establecido por el test de Chambers, a tiempos y concentración de exposición referidas por el fabricante (ver foto 2).

Foto N° 2

Placa de la viabilidad frente una placa en la que hubo una reducción del 99.999% de acuerdo al limite establecido por el test de Chambers.



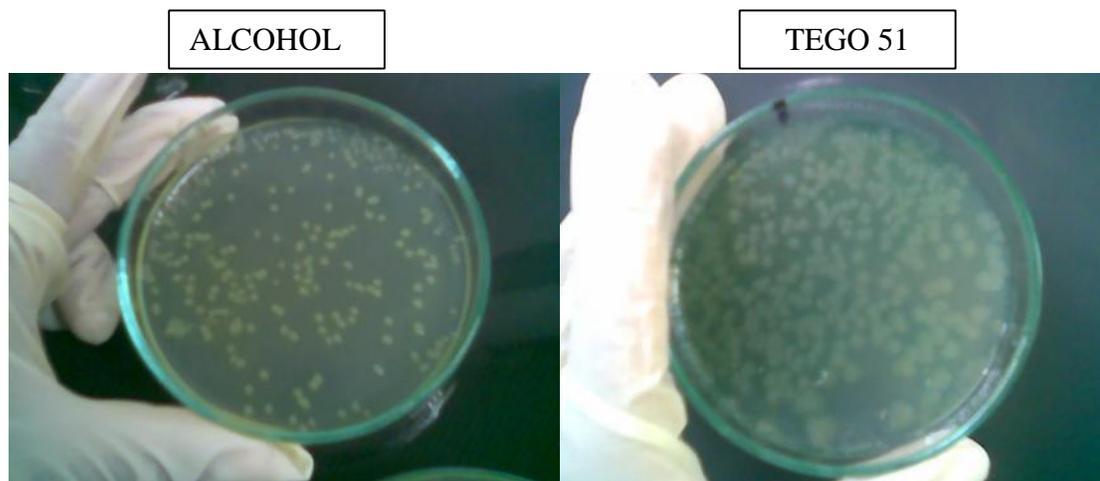
²⁵ L. López, J, Romero. Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. <http://www.scielo.org.ve/art521.htm>

De acuerdo con nuestros resultados (**Ver anexo IV**) podemos observar que: a concentraciones bajas de los desinfectantes (TEGO 51, Timerosal y Alcohol), existe un tiempo inicial de muerte muy lento de las cepas enfrentadas. Este factor es tan crítico que se sabe que concentraciones mínimas de casi cualquier desinfectante no solo no elimina los microorganismos, sino que permiten su desarrollo y generación de resistencia y adaptabilidad.²⁶

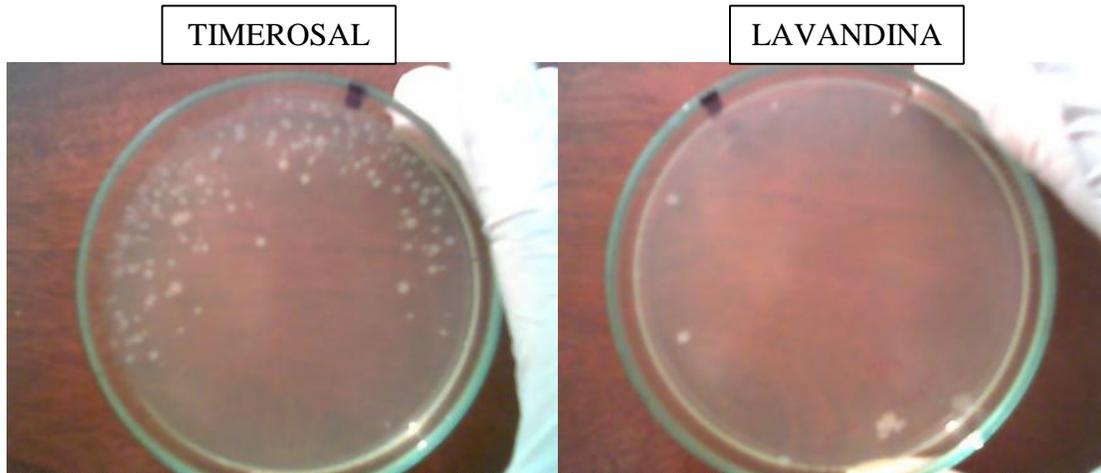
En el gráfico 3 (Ver Anexo IV, C) mostramos el comportamiento que tiene la *Pseudomonas aeruginosa* frente a los desinfectantes, observándose que es una cepa resistente al ataque de los desinfectantes; esto se debe al contenido más alto de fosfolípidos y lípidos neutros, que incrementa la resistencia a estos productos. (ver foto N° 3)

Foto N° 3

**Se muestra el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa* frente a los desinfectantes:
Alcohol, TEGO 51, Timerosal, Lavandina.**



²⁶ Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos.
<http://www.scielo.org.ve/art521.htm>



Esta cepa de estudio no se elimina eficientemente, con 3 de los 5 desinfectantes evaluados (Timerosal, TEGO 51 y alcohol) y se mantiene viable pasado el tiempo de exposición.

El Timerosal (Ver Anexo II, A) por poseer características bacteriostáticas y el alcohol se consideran ineficientes para realizar la sanitización, por presentar una reducción inadecuada de bacterias a un tiempo de exposición superior a los 15 min. (ver foto N° 4), ya que se necesitaría grandes concentraciones de Timerosal para alcanzar un efecto bactericida.

Encontramos que el Hipoclorito de sodio es capaz de eliminar la mayoría de las cepas bacterianas en un corto periodo de tiempo y a una concentración de hasta 0.08%. (ver foto N° 5), determinando que es un buen desinfectante. Los resultados son similares a los expuestos por Hernández y Silva 1994 en el hospital San Juan de Dios, Santa Fe de Bogota, Colombia. Donde fueron inhibidos en 5 a 10 minutos de exposición²⁷.

Al comparar las graficas (Ver anexo III: E, F) observamos que después de un uso continuo de los desinfectantes durante dos años, la cepa de *Micrococcus s.f.* aislada, no se evidencio generación de adaptación al ataque de los desinfectantes que en el estudio se consideraron óptimos a altas concentraciones (Timerosal, Tego51 y Alcohol), el uso

²⁷ Henao S., C Sierra Acción bactericida del Acido Hipocloroso.
www.revmed.unal.edu.co/revistafm/v51n3/v51n3pdf/v51n3a2.pdf

muy extendido de los antisépticos - desinfectantes, implica la posibilidad muy real de que se pueda desarrollar resistencia microbiana a estos agentes (el termino más adecuado es ADAPTACION).²⁸

Una de las medidas por la cual se puede minimizar el riesgo de presentación de este problema consiste en hacer una rotación de antisépticos - desinfectantes en el ámbito hospitalario, de laboratorio clínico y/o industria farmacéutica. La rotación de estos a nivel de la industria farmacéutica puede coadyuvar en gran medida a disminuir la generación de cepas resistentes, aunque no se encontraron estudios claros sobre la eficacia de la rotación de los desinfectantes.

Dada una concentración de desinfectante, existe un tiempo mínimo de acción dado por el proveedor, que nos muestra los niveles de limpieza a seguir, es por eso esencial un buen lavado de la superficie, antes de intentar un proceso de desinfección o esterilización.²⁹ Así evitar las formas cubiertas, que impiden el contacto microorganismo-desinfectante, o se combinan con el agente formando compuestos menos activos.

En estados unidos, las entidades reguladoras, FIFRA, EPA exigen que el desinfectante sea probado para establecer las concentraciones y tiempos requeridos por los diferentes microorganismos y de esta manera, determinar su óptima utilización para lograr una desinfección efectiva, a parte, las empresas que fabrican estos, deben documentar la efectividad declarada en las etiquetas de los productos.³⁰

²⁸ JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ Resistencia y adaptación de patógenos a desinfectantes www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/03/26/5687.php

²⁹ Medrano A. Efectividad de los Desinfectantes y Antisépticos Intrahospitalarios. Instituto Nacional del Tórax,

³⁰ “Desinfectantes y antisépticos” <1072> USP 30 Versión en español. Pág. 554

X. CONCLUSIONES

A. *Conclusión General.*

- Se evaluó el efecto bactericida de cinco desinfectantes: TEGO 51, GERMEKIL, TIMEROSAL, LAVANDINA, ALCOHOL, definiendo experimentalmente, las concentraciones de trabajo y tiempos de exposición adecuadas para estos desinfectantes, realizando pruebas "In Vitro", ver Tabla N° 4. (condiciones recomendadas para el uso de desinfectantes).

B. *Conclusiones Específicas.*

- Se establecieron mediante ensayos "*in vitro*", los neutralizantes y concentraciones adecuadas de acuerdo a la naturaleza de los desinfectantes, de acuerdo a los lineamientos sentados en la USP 30. (Ver tabla 2)
- Se establecieron que ninguno de los neutralizantes presentaba toxicidad fuera de los límites especificados, para las cepas de estudio, obteniendo como resultado un porcentaje de supervivencia mayor al 75 %, según USP 30. (Ver tabla 3).
- Determinamos que, no todas las concentraciones y tiempos de exposición recomendados por los procedimientos operativos estándar, eran adecuados. Podemos observar esta divergencia. (Ver tabla 4)
- Se determinó que la Lavandina y el Germekil, son desinfectantes muy efectivos a concentraciones bajas y tiempos cortos de exposición, alcanzando una efectividad del 100% de eficacia bactericida a un tiempo mínimo de un minuto.

El Tego 51, sería una tercera opción como desinfectante, ya que cumple con las especificaciones del fabricante, a una concentración de 1% y 0.7 %, con un tiempo de exposición mayor a los 5 minutos.

El Timerosal es un desinfectante de tipo bacteriostático, y no recomendado a bajas concentraciones ($< 0.07\%$), y a tiempos de exposición inferiores a 10 minutos, según los estudios realizados.

El Alcohol también demostró, no ser útil para la desinfección de ambientes de trabajo, por que al estar en contacto con agua se inactiva, a parte de disminuir su efectividad al contacto de sustancias orgánicas contaminantes. Se recomienda su uso a una concentración del 65% al 75 %, con un tiempo de exposición de 10 minutos sobre superficies de trabajo secas y limpias (mesones, utensilios).

- La *Pseudomonas aeruginosa*, no alcanza a los 99,996 % de eficacia bactericida a un tiempo de 5 minutos, con tres de cinco desinfectantes. Siendo esta la única cepa que presenta supervivencia al ataque del TEGO 51, TIMEROSAL y ALCOHOL.

Las cepas aisladas del ambiente de fabricación son susceptibles al ataque de cuatro de cinco desinfectantes ensayados, observándose que el Timerosal a una concentración de 0.04% es ineficaz, se recomienda evaluar este producto en pruebas de campo para estar seguros de su efectividad.



XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ministerio de Salud, **Normas de Buenas Prácticas de Manufactura**. Pág. 85
2. “Desinfectantes y antisépticos” <1072> USP 30 Versión en español. Pág. 554
3. Valoración de desinfectantes
http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bprincipal.htm
4. Especificaciones TEGO 51 <http://www.conexco.com.ar/producto.htm>
5. CONTROL DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
[mail.fq.edu.uy/~microbio/MGral/practico/tercerciclo.doc](mailto:fq.edu.uy/~microbio/MGral/practico/tercerciclo.doc)
6. Especificaciones GERMEKIL. Especificaciones del Proveedor
7. EDUCACIÓN CONTINUADA EN LENTES DE CONTACTO ES LA SOLUCIÓN O EL PROBLEMA. <http://www.franjapublicaciones.com/articulo/articles%20No/149.htm>
8. Leonardo Sánchez-Saldaña¹; Eliana Sáenz Anduaga. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES.
9. Manual de Desinfectantes <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema07.pdf>
10. Características de un desinfectante ideal
<http://www.academia.cat/societats/farmcl/l libre/higiene/332.pdf>
11. JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ Resistencia y adaptación de patógenos a desinfectantes
www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2003/03/26/5687.php
12. Bello T, Rivero I., H de Waard J. Inactivación de micobacterias con Desinfectantes Registrados como Tuberculicidas. Laboratorio de tuberculosis Inst. de biomedicina. Caracas.
13. Medrano A. Efectividad de los Desinfectantes y Antisépticos Intrahospitalario. Instituto Nacional del Tórax,
14. Henao S. Actividad bactericida del Acido Hipocloroso. Departamento Microbiología.
15. López L., Romero J., Ureta F. Acción germicida "in-vitro" de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago de Chile.
16. Yáñez E. Acción de los agentes químicos sobre las bacterias. Curso de microbiología general. <http://fai.unne.edu.ar/biología/microgeneral/micro-ianez/19-micro.html>.

17. PREGUNTAS SOBRE DESINFECTANTES.

www.coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bpreguntas.htm

18. Guía institucional para uso de antisépticos y desinfectantes. 2005;

<http://www.info.ccss.cr/germed/gestamb/samb08d2.htm>

19. Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. <http://www.scielo.org.ve/art521.htm>

20. www.javierhuertas.com/diluciones5.html

21. Valoración de desinfectantes

http://coli.usal.es/Web/educativo/m_especial/15bprincipal.htm

22. Manual de Desinfectantes <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema07.pdf>

FOTOGRAFIAS

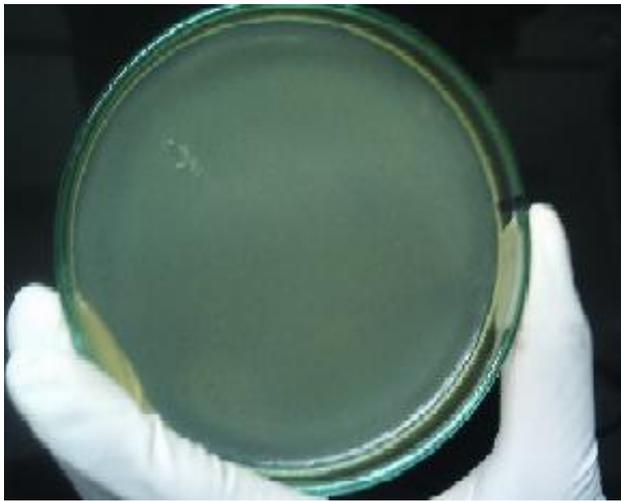
FOTO Nº 1

Materiales utilizados en la prueba, como los neutralizantes y modo de orden en el trabajo realizado.



Placa de la viabilidad frente una placa en la que hubo una reducción del 99.999% de acuerdo al límite establecido por el test de Chambers.

Placa con un 100% de eficacia bactericida (sin crecimiento)



Prueba de viabilidad (Número inicial de microorganismos)

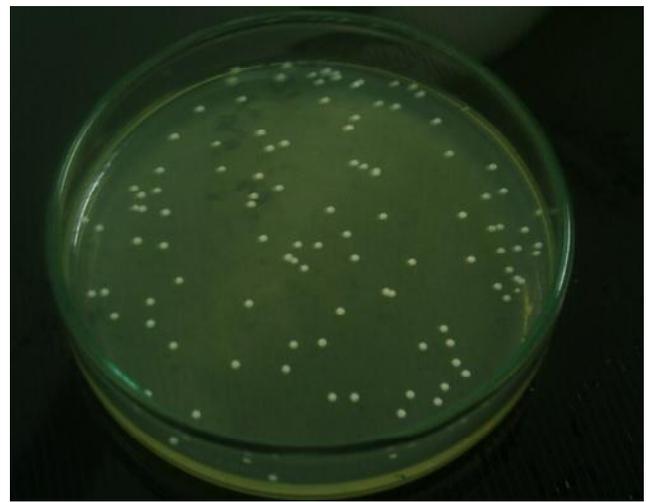


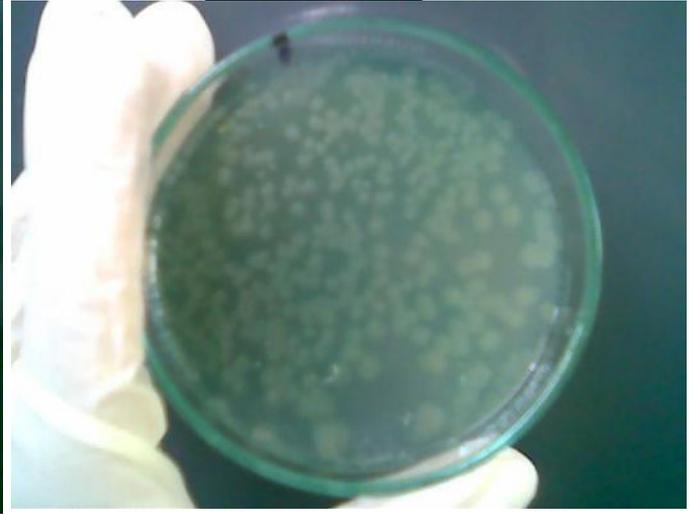
Foto N° 3

Se muestra el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa* frente a los desinfectantes: Alcohol, TEGO 51, Timerosal, Lavandina.

ALCOHOL



TEGO 51



TIMEROSAL



GERMEKIL



Foto N° 4

Se muestra la actividad del timerosal, frente a las diferentes cepas bacterianas en estudio, a concentración baja del desinfectante, viendo que promueve su desarrollo.

TIMEROSAL © 0.04 %

Staphylococcus aureus



Escherichia coli



Micrococcus spp



Staphilococcus spp

