



“ESTUDIO IN VITRO DE LA ACCIÓN MICROBICIDA DEL MONOPERSULFATO DE POTASIO Y EL HIPOCLORITO DE SODIO SOBRE LOS MICROORGANISMOS MÁS FRECUENTES EN AMBIENTES ODONTOLÓGICOS”.

AUTOR: OD. EZEQUIEL ESCUDERO GIACHELLA

DIRECTORA: PROF. DRA. TERESA BUTLER



Resumen:

Las enfermedades transmitidas en los ambientes odontológicos constituyen un problema relevante en salud pública a nivel mundial; incluyendo en su etiología microorganismos oportunistas. Estos pueden adherirse fácilmente a distintas superficies de trabajo (mesadas, pisos, canillas, platinas de equipos odontológicos) desarrollando rápidamente la formación de biopelículas contaminantes (estructuras que contienen polisacáridos que originan una malla viscosa que permite la adhesión de otros gérmenes oportunistas). Las bacterias instaladas en la película son menos sensibles a desinfectantes que las planctónicas (libres o inmersas en un medio líquido). Entre los microorganismos oportunistas más frecuentes que se adhieren a diferentes sustratos figuran: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Aspergillus fumigatus*. El objetivo general de esta investigación fue estudiar y comparar la acción microbicida del monopersulfato de potasio y el hipoclorito de sodio sobre los cinco microorganismos. Para cumplimentar el objetivo se utilizó in-vitro el método de dilución neutralización (A.F.N.O.R), para analizar el efecto microbicida del hipoclorito de sodio y el monopersulfato de potasio en cada unidad muestral (4 bacterias y 1 hongo). Las variables consideradas fueron: suspensión bacteriana/ fúngica, desinfectante y neutralizante. Los resultados obtenidos indicaron que el hipoclorito de sodio desarrolló acción microbicida en todas las cepas, mientras que el monopersulfato de potasio presentó sólo acción bactericida. Respecto a la acción fungicida del monopersulfato de potasio no hubo coincidencia con las indicaciones del fabricante en relación al tiempo de exposición, lográndose el efecto a las 10 horas de contacto. El conocimiento del mejor desinfectante en cada instancia particular; su acción; concentración; tiempo de exposición; técnica; almacenamiento y el control de las indicaciones del fabricante optimizan los resultados esperados.

Palabras clave: ambientes odontológicos, microorganismos, desinfectantes, dilución, neutralización.

Abstract:

Diseases transmitted in dental environments constitute a relevant problem in public health worldwide; including in its etiology opportunistic microorganisms. Those can easily adhere to different work surfaces (countertops, floors, faucets, dental equipment plates) developing the formation of contaminating biofilms (structures which contains polysaccharides and originates a viscous mesh that allows the adhesion of others opportunistic germs). Bacteria installed in that film are less sensitive to disinfectants than planktonics (free or immersed in a liquid medium). Most frequent opportunistic microorganisms that adhere to different substrates are: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Aspergillus fumigatus*. The general objective of this research was to study and compare the microbicidal action of potassium monopersulfate and sodium hypochlorite on those five microorganisms. To complete the objective, the

neutralization dilution method (A.F.N.O.R) was used in-vitro to analyze the microbicidal effect of sodium hypochlorite and potassium monopersulfate in each sample unit (4 bacterias and 1 fungus). All the variables considered were: bacterial / fungal suspension, disinfectant and neutralizing. The results obtained indicated that sodium hypochlorite developed a microbicidal action in all strains, while potassium monopersulfate showed only bactericidal action. Regarding fungicidal action of potassium monopersulfate there was no coincidence with manufacturer's indications in relation to exposure time, and the effect was achieved after 10 hours of contact. Knowing the best disinfectant in each particular instance; its action; concentration; exhibition time; technique; Storage and control of manufacturer's indications optimize the expected results.

Key words: Dental environments, microorganisms, disinfectants, dilution, neutralization.

*A mis padres por su amor incondicional.
A la gran mujer de mi vida Valentina y a mis
hijas Ofelia y Libertad por estar siempre a mi
lado.*

Agradezco la colaboración recibida en este trabajo a:

Las autoridades de la Facultad de Odontología, Dr. Gabriel Lazo, Dra. María Mercedes Medina y Sergio Lazo quienes en más de una oportunidad me infundieron ánimo para lograr el objetivo propuesto.

La Directora de tesis Dra. Teresa Butler quien me dedicó su tiempo y sabiduría y con quien me une una gran amistad.

A mi directora de pasantía Dra. Ángela León Peláez, quien desde la Facultad de Ciencias Exactas puso a disposición el laboratorio de Microbiología brindándome desinteresadamente toda su experiencia científica y práctica.

A Ana y Mariana por estar presentes durante toda mi pasantía y enriquecer mis conocimientos.

A la Dra. Susana Micinquevich por su constante apoyo y buena predisposición.

A Licenciada en Biotecnología y Doctora en Ciencias Básicas y Aplicadas Leticia Betancor de la Universidad de Quilmes por su generosidad.

Y a todos aquellos que de una u otra manera me han motivado para realizar esta investigación.

*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
también es un niño colocado ante fenómenos naturales
que lo impresionan como un cuento de hadas”.*

Marie Curie.

Índice

1- Marco teórico.	1
1.1 Ecosistema bucal.	2
1.2 Infecciones cruzadas.	3
1.3 Fuentes de infección.	3
1.3.1- modos de transmisión.	4
2- Introducción.	6
2.1- Microorganismos oportunistas.	6
2.1.1- <i>Staphylococos aureus</i> .	6
2.1.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	7
2.1.3- <i>Acinetobacter baumannii</i> .	7
2.1.4- <i>Escherichia coli</i> .	8
2.1.5. <i>Aspergillus fumigatus</i> .	8
2.2- Desinfección.	9
2.2.1- Factores a tener en cuenta en la acción y el uso de los desinfectantes.	9
2.2.2- Dianas celulares de acción de los desinfectantes.	9
2.2.3- Inactivación y neutralización de los desinfectantes.	11
2.3- Hipoclorito de sodio.	11
2.4- Monopersulfato de potasio.	14
3- Objetivos e hipótesis.	16
3.1- Objetivo general.	16
3.2- Objetivos específicos.	16
3.3- Hipótesis.	16
4- Materiales y métodos.	17
4.1- Diseño metodológico.	17
4.2- Estudio y comparación de los desinfectantes sobre microorganismos.	17
4.2.1- Activación de las cepas bacterianas.	17
4.2.1.a- Caldo Nutritivo.	17
4.2.1.b- Agar mantenimiento.	19
4.3- Preparación de la suspensión de ensayo.	20
4.3.1- Diluyente.	21
4.3.2- Medición de la densidad óptica por espectrofotometría.	22
4.3.3- Diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en diluyente.	23
4.3.4- Agar recuento.	24
4.4- Recuento de bacterias obtenidas en la última dilución.	25
4.5- Ensayo microbicida del Hipoclorito de sodio y el Monopersulfato de potasio.	26
4.5.1- Preparación de los desinfectantes y neutralizantes.	26
4.5.1.a- Preparación del neutralizante a concentración simple (1X).	27
4.5.1.b- Procedimiento para el ensayo del neutralizante.	28
4.5.1.c- Preparación del neutralizante a doble concentración (2X).	28
4.6- Ensayo de las suspensiones fúngicas.	29

4.6.1- Activación de la cepa fúngica.	29
4.6.1.a- Solución de esporas.	29
4.6.1.b- Agar papa.	30
4.6.2- Pasos previos a la técnica.	31
4.7- Prueba de dilución y neutralización de desinfectantes sobre microorganismos presentes en ambientes odontológicos.	32
4.7.1- Prueba de dilución/ neutralización del monopersulfato de potasio sobre <i>S. aureus</i> .	33
4.7.1.a- Coloración de Gram.	33
4.7.1.b- Ensayo de la suspensión bacteriana con <i>Staphylococcus aureus</i> .	35
4.7.1.c- Ensayo del desinfectante (monopersulfato de potasio).	35
4.7.1.d- Ensayo del neutralizante (bicarbonato de sodio).	36
4.7.2- Prueba de dilución/ neutralización del hipoclorito de sodio sobre <i>S. aureus</i> .	37
4.7.2.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>S. aureus</i> .	37
4.7.2.b- Ensayo del desinfectante (hipoclorito de sodio).	37
4.7.2.c- Ensayo del neutralizante (tiosulfato de sodio).	38
4.7.3- Prueba de dilución/ neutralización del monopersulfato de potasio sobre <i>E. coli</i> .	39
4.7.3.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>E. coli</i> .	40
4.7.3.b- Ensayo del desinfectante (monopersulfato de potasio).	41
4.7.3.c- Ensayo del neutralizante (bicarbonato de sodio).	41
4.7.4- Prueba de dilución/ neutralización del hipoclorito de sodio sobre <i>E. coli</i> .	42
4.7.4.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas <i>E. coli</i> .	42
4.7.4.b- Ensayo del desinfectante (hipoclorito de sodio).	43
4.7.4.c- Ensayo del neutralizante (tiosulfato de sodio).	43
4.7.5- Prueba de dilución/ neutralización del monopersulfato de potasio sobre <i>P. aeruginosa</i> .	44
4.7.5.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>P. aeruginosa</i> .	45
4.7.5.b- Ensayo del desinfectante (monopersulfato de potasio).	46
4.7.5.c- Ensayo del neutralizante (bicarbonato de sodio).	46
4.7.6- Prueba de dilución/ neutralización del hipoclorito de sodio sobre <i>P. aeruginosa</i> .	47
4.7.6.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>P. aeruginosa</i> .	47
4.7.6.b- Ensayo del desinfectante (hipoclorito de sodio).	48
4.7.6.c- Ensayo del neutralizante (tiosulfato de sodio).	49
4.7.7- Prueba de dilución/ neutralización del monopersulfato de potasio sobre <i>A. baumannii</i> .	49
4.7.7.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>A. baumannii</i> .	50
4.7.7.b- Ensayo del desinfectante (monopersulfato de potasio).	51
4.7.7.c- Ensayo del neutralizante (bicarbonato de sodio).	52
4.7.8- Prueba de dilución/ neutralización del hipoclorito de sodio sobre <i>A. baumannii</i> .	52

4.7.8.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>A. baumannii</i> .	52
4.7.8.b- Ensayo del desinfectante (hipoclorito de sodio).	53
4.7.8.c- Ensayo del neutralizante (tiosulfato de sodio).	53
4.7.9- Prueba de dilución/ neutralización del monopersulfato de potasio sobre <i>A. fumigatus</i> .	54
4.7.9.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>A. fumigatus</i> .	55
4.7.9.b- Ensayo del desinfectante (monopersulfato de potasio).	55
4.7.9.c- Ensayo del neutralizante (bicarbonato de sodio).	56
4.7.9.d- Modificación del ensayo.	57
4.7.9.e- Ensayo de la suspensión fúngica, del desinfectante y neutralizante (tiempo de contacto 1 hora).	57
4.7.9.f- Ensayo de la suspensión fúngica, del desinfectante y neutralizante (tiempo de contacto 10 horas).	58
4.7.10- Prueba de dilución/ neutralización del hipoclorito de sodio sobre <i>A. fumigatus</i> .	60
4.7.10.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con <i>A. fumigatus</i> .	60
4.7.10.b- Ensayo del desinfectante (hipoclorito de sodio).	60
4.7.10.c- Ensayo del neutralizante (tiosulfato de sodio).	61
4.8- Pruebas estadísticas.	62
5- Resultados.	64
5.1- Estudio de la acción microbicida de los desinfectantes.	64
5.1.1- Análisis estadístico de los resultados obtenidos. Significancia.	64
5.2- Resultados del recuento de UFC en placas en relación al hipoclorito de sodio.	64
5.2.1- Análisis de las suspensiones bacterianas con hipoclorito de sodio.	64
5.2.1.a- Recuento de las UFC en placas con <i>E. coli</i> .	64
5.2.1.b- Recuento de las UFC en placas con <i>S. aureus</i> .	65
5.2.1.c- Recuento de las UFC en placas con <i>P. aeruginosa</i> .	65
5.2.1.d- Recuento de las UFC en placas con <i>A. baumannii</i> .	66
5.2.1.e- Recuento comparativo del valor medio de las UFC de las diferentes bacterias.	66
5.2.2- Resultados del efecto bactericida del hipoclorito de sodio.	67
5.2.2.a- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre <i>E. coli</i> .	67
5.2.2.b- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre <i>S. aureus</i> .	68
5.2.2.c- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre <i>P. aeruginosa</i> .	68
5.2.2.d- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre <i>A. baumannii</i> .	69
5.2.2.e- Análisis comparativo del efecto bactericida del hipoclorito de sodio.	69
5.2.3- Resultado del neutralizante sobre el hipoclorito de sodio.	70
5.2.3.a- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo "A" y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	70

5.2.3.b- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	71
5.2.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	71
5.2.3.d- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	72
5.2.3.e- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	72
5.2.3.f- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	73
5.2.3.g- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	73
5.2.3.h- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	74
5.2.3.i- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	74
5.2.3.j- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	75
5.2.3.k- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	75
5.2.3.l- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	76
5.3- Resultados del recuento de UFC en placas en relación al monopersulfato de potasio.	76
5.3.1- Análisis de las suspensiones bacterianas con monopersulfato de potasio.	76
5.3.1.a- Recuento de las UFC con <i>E. coli</i> .	76
5.3.1.b- Recuento de las UFC con <i>S. aureus</i> .	77
5.3.1.c- Recuento de las UFC con <i>P. aeruginosa</i> .	77
5.3.1.d- Recuento de las UFC con <i>A. baumannii</i> .	78
5.3.1.e- Recuento comparativo del valor medio de las UFC de las diferentes bacterias.	78
5.3.2- Resultado del efecto bactericida del monopersulfato de potasio.	79
5.3.2.a- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>E. coli</i> .	79
5.3.2.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>S. aureus</i> .	80
5.3.2.c- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>P. aeruginosa</i> .	80
5.3.2.d- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>A. baumannii</i> .	81
5.3.2.e- Análisis comparativo del efecto bactericida del monopersulfato de potasio (valores medios).	81
5.3.3- Resultados del neutralizante sobre el monopersulfato de potasio.	82

5.3.3.a- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	82
5.3.3.b- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	83
5.3.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para Monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>E. coli</i> .	83
5.3.3.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	84
5.3.3.e- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	84
5.3.3.f- Comparación del valor medio del neutralizante para Monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>S. aureus</i> .	85
5.3.3.g- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	85
5.3.3.h- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	86
5.3.3.i- Comparación del valor medio del neutralizante para Monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>P. aeruginosa</i> .	86
5.3.3.j- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	87
5.3.3.k- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	87
5.3.3.l- Comparación del valor medio del neutralizante para Monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. baumannii</i> .	88
5.4- Acción fungicida de los desinfectantes.	88
5.4.1- Resultados del recuento de UFC de <i>A. fumigatus</i> en relación al hipoclorito de sodio.	88
5.4.1.a- Recuento de UFC en placas con <i>A. fumigatus</i> .	89
5.4.2- Resultado del efecto fungicida del hipoclorito de sodio.	89
5.4.2.a- Efecto del hipoclorito de sodio sobre <i>A. fumigatus</i> .	90
5.4.3- Resultados del neutralizante sobre el hipoclorito de sodio.	90
5.4.3.a- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	90
5.4.3.b- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	91
5.4.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. fumigatus</i> .	91
5.4.4- Ensayo completo del monopersulfato de potasio sobre el <i>A. fumigatus</i> . Técnica convencional.	92
5.4.4.a- Recuento de las UFC en placas con <i>A. fumigatus</i> .	92
5.4.4.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>A. fumigatus</i> .	92
5.4.4.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio	92

en relación al tubo “A” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	
5.4.4.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	93
5.4.4.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. fumigatus</i> .	93
5.4.5- Ensayo completo con modificación del tiempo de contacto del monopersulfato de potasio sobre el <i>A. fumigatus</i> (1 hora).	94
5.4.5.a- Recuento de las UFC en placas con <i>A. fumigatus</i> .	94
5.4.5.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>A. fumigatus</i> .	94
5.4.5.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	94
5.4.5.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	95
5.4.5.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. fumigatus</i> .	95
5.4.6- Ensayo completo con modificación del tiempo de contacto del monopersulfato de potasio sobre el <i>A. fumigatus</i> (10 horas).	96
5.4.6.a- Recuento de las UFC en placas con <i>A. fumigatus</i> .	96
5.4.6.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre <i>A. fumigatus</i> .	96
5.4.6.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	97
5.4.6.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de <i>A. fumigatus</i> .	97
5.4.6.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A y B” y a una dilución bacteriana de <i>A. fumigatus</i> .	98
6- Discusión	99
6.1- Importancia clínica y recomendaciones desde bioseguridad.	101
7- Conclusiones.	103
8- Anexo.	105
8.1- Resultados (datos cuantitativos).	105
9- Bibliografía.	119

1-Marco teórico

Los ambientes de salud actúan como reservorios y fuentes de infecciones fácilmente transmisibles. Los factores ambientales que predisponen al contagio son generalmente: la carga orgánica suspendida en el aire, el agua sanitaria que entra en contacto directo con el paciente, el personal de salud, los dispositivos y/o aparatologías médico-odontológicas, las diferentes superficies (mesadas, pisos, azulejos, salivaderas, piletas entre otros) y los instrumentos que toman contacto con la piel y mucosas del paciente.

Existen ciertos patógenos que están asociados con las diferentes formas de transmisión y el reservorio ambiental, y otros que son microorganismos multirresistentes que también se asocian al medio ambiente.

En la práctica odontológica el profesional, auxiliares y los pacientes, se encuentran asociados a una amplia variedad de especies de microorganismos patógenos, que causan infecciones en la cavidad oral o a nivel sistémico. Los medios transmisores de infección son la saliva, el fluido gingival, la sangre y el aire. Este último, considerado un factor de riesgo por la posible diseminación de los aerosoles microbianos transportados, generalmente a las vías aéreas respiratorias ⁽¹⁻²⁾.

En la consulta y/o práctica odontológica, los microorganismos pueden ingresar por las siguientes vías: cortes, erosiones en la piel, instrumentos cortantes o punzantes, membranas mucosas (de la boca, nariz y ojos), inhalación e ingestión.

Entre los medios de transmisión de microorganismos más frecuentes se encuentran el aire y las partículas inertes como el polvo, gotas de agua, y otros; que sirven como medio de transporte de la microbiota presente, hacia las diferentes superficies.

La infección de estos microorganismos oportunistas requiere la presencia de una serie de condiciones conocidas como “cadena de infección”. Para ello, tendrá que existir un huésped susceptible (individuo infectado), capacidad de virulencia suficiente del germen y una puerta de ingreso que le permita al organismo vivo tomar contacto con el huésped susceptible. Por ende, es imprescindible que se tomen todas las medidas de bioseguridad indicadas para evitar la transmisión de infección.

La Odontología como ciencia de la salud humana ejerce un rol importante en el mantenimiento del estado de salud de los pacientes.

Las evidencias muestran que la relación existente entre el estado de salud bucal e integral repercute en la calidad de vida de un individuo. La mayoría de las enfermedades de origen bucal pueden ser controladas mediante medidas preventivas: las que derivan de los diagnósticos tempranos y las relacionadas con el cumplimiento de las normas de bioseguridad. Las mismas, no sólo disminuirían la aparición de una enfermedad bucal sino también sistémica. En éste ítem, no pueden dejarse de lado a las infecciones cruzadas contraídas en los lugares de atención ⁽³⁾. Por ende, no solo es

importante el control atinente al paciente, sino también al medio ambiente en el que se realizan las prácticas odontológicas.

Para poder comprender las infecciones transmisibles en los consultorios odontológicos, de ámbitos públicos como privados, se definirán algunos conceptos tales como **ecosistema bucal, infección cruzada y vías de transmisión** ⁽⁴⁾.

1.1- Ecosistema bucal

El ecosistema bucal es un sistema abierto, formado por una comunidad compleja, dinámica e interrelacionada de microorganismos que comparten un mismo hábitat, del que participan constituyentes bióticos y abióticos.

Dicho ecosistema está conformado por diferentes microambientes con distintas propiedades: piezas dentarias, mucosas, saliva, lengua, cuerpos extraños, humedad constante de 37° C°, pH neutro, potencial redox variable y abundante suministro nutricional. Cada microambiente es colonizado por diversos tipos de microorganismos definidos según los estilos de vida de cada una de las especies.

La microbiota bucal es muy rica y compleja, en ella se hallan más de 500 especies bacterianas agrupadas en veintidós géneros, cuya minoría representan a los patógenos potenciales que se desenvuelven de acuerdo a sus mecanismos de virulencia ⁽⁵⁻⁶⁾.

Las especies microbianas se encuentran organizadas en comunidades de poblaciones que cohabitan en un lugar y tiempo determinado, pudiendo dar origen a redes tróficas. Las comunidades más conocidas son las que pertenecen a la microbiota supragingival y subgingival. La primera caracterizada por la presencia de cocos Gram positivos aerobios facultativos y la segunda representada por bacilos Gram negativos anaerobios estrictos. Las antes mencionadas constituyen biopelículas que se adhieren sobre las distintas superficies del sistema estomatognático pudiendo atraer a otras especies patógenas oportunistas del medio interno o externo ⁽⁷⁾.

En consecuencia, la permanente manipulación de instrumental, materiales y otros elementos en la atención odontológica así como el medio ambiente (salivaderas, foco del sillón odontológico, mesadas, piletas contaminadas con la carga orgánica de la saliva, sangre y pus, el aire entre otros); el tránsito permanente de pacientes, sus acompañantes, hacen que los consultorios odontológicos predispongan a las contaminaciones cruzadas. Por ello, es de fundamental importancia, que no sólo se apliquen las normas de Bioseguridad sino también que los productos para la desinfección del instrumental y el medio de trabajo sean correctamente seleccionados.

1.2- Infecciones cruzadas

En el transcurso de las prácticas odontológicas, el personal clínico (profesionales - auxiliares) y los pacientes, se encuentran expuestos a gran variedad de microorganismos susceptibles a infecciones exógenas y endógenas. Las exógenas también son conocidas como infecciones cruzadas, causadas por agentes de la propia flora del paciente ⁽⁸⁾.

En Odontología, la transmisión de infecciones se produce a través de los fluidos orgánicos más frecuentes como son la saliva, el fluido gingival y la sangre; a los que se suma el aire del ambiente y las superficies, que en ocasiones pueden albergar ciertos patógenos durante un largo período de tiempo, tal como el *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus* spp, entre otros ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

En síntesis, durante la atención odontológica se constituye una situación de riesgo.

1.3- Fuentes de transmisión

A través de este medio de transmisión se pueden enumerar diferentes reservorios y fuentes como:

- Humanos: Cuando un paciente está colonizado por gérmenes patógenos fácilmente transferibles, el contacto con el personal de salud puede ser una importante vía de contagio, ya que se puede transferir la microbiota oportunista causando una infección cruzada. Con respecto al personal de salud, el reservorio más frecuente es la piel, que puede contener gérmenes nosocomiales, como el *S. aureus* o *Mycobacterium tuberculosis*.
- No humanos: las diferentes superficies y los sistemas de ventilación son fuentes importantes de microorganismos infectantes (*Aspergillus* spp, *Legionella*). Otros gérmenes como *P. aeruginosa*, *alcaligenes*, etc) se pueden transmitir a través del agua.
- Las paredes y pisos también pueden albergar microorganismos oportunistas, sobre todo cuando acumulan suciedad. La mayoría de los patógenos más habituales en los ambientes de salud, pueden sobrevivir en superficies inanimadas secas desde horas hasta meses. Entre las especies más frecuentes se puede mencionar al *E. coli*, y *klebsiella* spp.
- A través de vectores: en los ambientes de salud de alto tránsito de personas, los vectores más importantes son los trabajadores de salud, los pacientes y sus acompañantes. Siendo el reservorio más importante la piel.
- El instrumental médico-odontológico puede contaminar mediante su uso, sobre todo durante su lavado, desinfección y esterilización incorrecta o cuando queda depositada la humedad.

- Fluidos orgánicos: tal como la sangre, saliva y pus, también pueden actuar como reservorios y portadores de diferentes tipos de gérmenes.

1.3.1- Modos de transmisión

- Por contacto: es la forma más frecuente. El contacto con la piel y las grandes gotas respiratorias que pueden viajar a escasos metros de distancia. Dentro de los microorganismos que se transmiten por esta vía podemos mencionar la *N. meningitidis*, *adenovirus*, y *parainfluenza*.
- Fecal: en ocasiones se pueden transmitir infecciones causadas por *E. coli*, *Pseudomonas spp*, *C. difficile*, *Rotavirus* y *Enterobacter spp*.
- Vía aérea: consiste en la diseminación de infecciones a través de pequeñas gotitas que pueden permanecer en el aire durante largos períodos de tiempo. Por ej. El *Bacilo tuberculosis*.
- Aire ambiental: puede contener algunos microorganismos o formas esporuladas altamente contaminantes, tal como esporas fúngicas y *Legionella*.
- Vía sanguínea: esta forma de transmisión puede realizarse a través de las transfusiones sanguíneas o riesgo por accidentes. Este fluido orgánico puede transmitir infecciones causadas por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), bacterias y parásitos ⁽⁴⁻¹¹⁻¹²⁻¹³⁾.

Por todo lo citado anteriormente, se puede considerar que el espacio odontológico expone permanentemente a los profesionales, auxiliares y a los propios pacientes al contagio de microorganismos oportunistas, potencialmente patógenos. Las infecciones más frecuentes en este medio son: tuberculosis, neumonía, virosis, aspergilosis, candidiasis, entre otras (Cayón M, y colab. 2016).

Entre las estrategias para el control de las infecciones se encuentran:

- Lavado de manos y utilización de guantes.
- Protección contra aerosoles y salpicaduras.
- Limpieza y desinfección de las superficies de trabajo.
- Limpieza, desinfección y esterilización del instrumental.
- Gestión de residuos y desechos controlados.

Para la desinfección los productos más utilizados en el área de bioseguridad son el hipoclorito de sodio y el glutaraldehído. No existe aún suficiente evidencia científica sobre la eficacia del efecto microbicida del monopersulfato de potasio; sustancia química relativamente nueva en el mercado nacional. Por lo tanto, es de suma

importancia que en los diferentes lugares de atención odontológica se implemente un adecuado protocolo de desinfección y normas de bioseguridad que garanticen la calidad del área de trabajo.

2-Introducción

Las enfermedades transmitidas en los ambientes de atención médico/odontológicos, han sido reconocidas como un importante problema de salud pública mundial. La mayoría son causadas por lo llamados microorganismos oportunistas que se instalan en el individuo en determinadas ocasiones, donde juegan un rol importante los diferentes factores ambientales como la humedad, el polvo, la utilización de aerosoles, el transporte de organismos vivos por otra persona, el agua utilizada y la mala desinfección o esterilización del instrumental empleado en las distintas prestaciones.

Los microorganismos se pueden adherir fácilmente a distintas superficies de trabajo como por ejemplo; mesadas, platinas de los equipos odontológicos, pisos, canillas, desarrollando rápidamente la formación de una biopelícula contaminante. Dicha estructura, contiene polisacáridos que dan origen a una malla viscosa la cual permite la adhesión de otros gérmenes oportunistas. Las bacterias instaladas en la película suelen ser más resistentes a la acción de ciertos desinfectantes en comparación con las que se encuentran en estado planctónico (libres o inmersas en un medio líquido).

Entre los microorganismos oportunistas más hallados que se adhieren a diferentes sustratos, se encuentran: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y el *Aspergillus fumigatus*.

2.1- Microorganismos oportunistas

2.1.1- *Staphylococcus aureus*:

Es una bacteria cocoidea en forma de racimo que pertenece a la familia Staphylococaceae. Es un coco Gram positivo cuyo tamaño oscila entre 0,8 a 1 micra de diámetro, es inmóvil, anaerobio facultativo y coagulasa positivo. Algunas cepas poseen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad virulenta. Sus hospedadores son los humanos y animales de sangre caliente. Pueden sobrevivir en el ambiente durante semanas, en amplios períodos en tejidos y órganos de animales, durante días en la piel del individuo, en el suelo y en la superficie de objetos metálicos y de vidrio ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Esta bacteria se localiza en procesos infecciosos de diferentes tipos en los que se comporta como una especie patógena o formando parte de la microbiota de los individuos que la portan. Es la especie más patógena del género y presenta diversos mecanismos de virulencia para ejercer daño en los tejidos del huésped. Algunos grupos de personas son más propensas a ser colonizadas por el *Staphylococcus aureus*, como el personal de la salud, existiendo evidencia de más de un 50 % de portación nasal. Las vías de transmisión de la especie mencionada suelen ser por contacto con personas, animales o elementos contaminados (instrumentos, superficies, etc). Entre las vías de entrada se mencionan heridas y mucosas, la

inoculación accidental por accidentes o cortes con objetos contaminados y mordeduras de animales ⁽¹⁴⁻¹⁶⁻¹⁷⁾. Es frecuente que de origen a una enfermedad nosocomial, afectando los pulmones, huesos (osteomielitis), el corazón y el cerebro, ya que se disemina por vía hematológica. Pueden ocasionar infecciones locales de la piel y las mucosas (impétigo, foliculitis, forunculosis, conjuntivitis, etc.), e infecciones internas que se complican en individuos inmunodeprimidos, pudiendo producir endocarditis, meningitis, artritis séptica y neumonía que pueden llegar a ser mortales ⁽¹⁸⁾.

2.1.2-Pseudomonas aeruginosa:

Constituyen un género específico dentro del grupo de los bacilos Gram negativos. Poseen la particularidad de desplazamiento sobre diferentes sustratos, mediante flagelos, lo que les facilita su dispersión por diferentes ambientes. Esta bacteria posee un metabolismo muy activo, a partir del cual se genera una matriz de polisacáridos, que posee un antígeno capaz de una transferencia de genes horizontal, inserción microsomal, conversión lisogénica, conversión genómica, mediante las señales químicas de “Quórum sensing”. Todas estas propiedades, facilitan a los flagelos movilizarse sobre las diferentes superficies, con la consecuente formación de una película adherente ⁽¹⁹⁾.

Pseudomonas spp. presenta gran resistencia en los ambientes húmedos pudiendo causar infecciones en huesos, sangre, pulmones, ojos, tracto urinario y válvulas cardíacas. Los pacientes diabéticos e inmunocomprometidos, poseen un alto riesgo de adquirir este tipo de infecciones en los ambientes de salud ⁽²⁰⁾.

2.1.3-Acinetobacter baumannii:

Al género *Acinetobacter* lo componen cocobacilos Gram negativos, no fermentativos, aerobios estrictos. Se han reportado 33 especies dentro de este género bacteriano. Entre las especies que pueden producir enfermedad en los humanos se identificaron *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter nosocomialis* entre otras ⁽²¹⁾.

La mayoría de las especies de este género son microorganismos que se encuentran en el ambiente (agua, plantas, vegetales, suelo) e incluso en la microbiota normal de la piel humana. Ciertos autores han reportado que el 31% del personal de salud es portador de bacilos gram negativos en la piel de sus manos, tal como el *A. baumannii*, pudiendo contribuir en la transmisión de las infecciones cruzadas. Esta especie de *Acinetobacter*, se considera un microorganismo de baja virulencia, excepto en pacientes inmunocomprometidos.

Diferentes investigadores refieren haber observado casos por *A. baumannii* multiresistente en un 38,7% ; dicha transmisión fue asociada al uso de guantes y batas del personal de salud. En un 4,5% se hallaron en las manos de los prestadores

de salud luego de la remoción de los guantes. También ha sido reportada la sobrevivencia de este microorganismo por periodos mayores a 25 días sobre superficies secas ⁽²²⁾.

Otro tipo de reservorio donde ha sido encontrada esta especie bacteriana fue en equipos de ventilación, humidificadores y colchones de salas de pacientes hospitalizados. Este microorganismo presenta multirresistencia en un alto porcentaje cuando quiere ser erradicado del medio ambiente.

Las enfermedades que más se pueden asociar con el *A. baumannii* son la neumonía, y meningitis con derivaciones ventriculares externas e infecciones en piel y tejidos blandos en pacientes quemados ⁽²³⁻²⁴⁾.

2.1.4-Escherichia coli:

Este tipo de bacteria se caracteriza por pertenecer al grupo de los bacilos Gram negativos. Un elemento a tener en cuenta de su morfología, son las fimbrias, que actúan como elementos de locomoción y particularmente de adhesión a diferentes sustratos. Posee la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos móviles tales como plásmidos y bacteriófagos, que le permiten adaptarse a diferentes medios. Algunos autores reportan que dichos elementos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y persistencia en los sistemas alimentarios ⁽²⁵⁾. *E. coli* junto con *Pseudomonas* influyen negativamente en la calidad de los ambientes clínicos cerrados y de alto tránsito de pacientes.

2.1.5-Aspergillus fumigatus:

En los últimos años, las micosis o enfermedades originadas por los hongos han ido en aumento. La susceptibilidad de los individuos a este tipo de infecciones es originada por el uso de inmunosupresores potentes y esteroides por tiempo prolongado. El *Aspergillus* spp es una clase de hongo o moho de tipo filamentoso que se encuentran en el medio ambiente. Las temperaturas cálidas y la humedad favorecen el desarrollo de este microorganismo. Pueden ser varias las especies de *Aspergillus* capaz de causar enfermedades pulmonares, siendo los más frecuentes *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*.

La aspergilosis se encuentra entre las infecciones fúngicas de fácil transmisión que puede causar lesiones en la cavidad bucal como a nivel sistémico ⁽²⁶⁾.

Es considerada una de las micosis frecuentes en lugares de alto tránsito de pacientes e instituciones de atención pública.

Una de las formas de contagio frecuente de este tipo de hongo es en ambientes laborales por inhalación de las conidias contenidas en el esputo que son rápidamente captadas por las células epiteliales de las vías aéreas y los macrófagos alveolares ⁽²⁷⁻²⁸⁻²⁹⁾.

Desde el punto de vista clínico son diversas las formas de aspergilosis que pueden observarse, entre éstas se destacan: la broncopulmonar alérgica, las formas invasivas en las vías aéreas, las formas cutáneas extrapulmonares y/o las diseminadas ⁽³⁰⁾.

2.2-Desinfección

Se entiende por desinfección a la acción de sustancias químicas (desinfectantes) que se aplican sobre material inerte, para la destrucción de los diferentes organismos vivos capaces de causar enfermedades. El vehículo utilizado para disolver los diferentes desinfectantes es el agua. No todos los desinfectantes poseen la acción de destrucción sobre los diferentes patógenos. Por ello son importantes los pasos previos; estos eliminan a los microorganismos mediante diferentes procesos: coagulación, sedimentación o filtración.

2.2.1- Factores a tener en cuenta en la acción y el uso de los desinfectantes:

a- Concentración del desinfectante:

La concentración varía de acuerdo al tipo de desinfectante que se utiliza, sin embargo es importante tener en cuenta que esta propiedad es inversamente proporcional al tiempo de exposición: cuanto mayor sea la concentración, menor tendrá que ser el tiempo de exposición. Este factor puede estar relacionado a la muerte de los microorganismos, ya que en ciertos productos, las concentraciones muy pequeñas, no causan la destrucción de la microbiota total.

b- pH.:

Es otra de las causas que condicionan la acción de los agentes químicos. Este factor determina el grado de disociación del producto químico actuante, teniendo en cuenta que la mayoría de los productos atraviesan más fácilmente las paredes y membranas plasmáticas de los microorganismos, cuando se encuentran en un estado químico liposoluble no ionizable o no disociado.

2.2.2- Dianas celulares de acción de los desinfectantes:

Los desinfectantes se seleccionan de acuerdo al sustrato sobre el que será aplicado y de acuerdo al grado de actividad selectiva sobre el mismo y a la microbiota que se desea combatir. Para ello se tendrán que considerar las diferentes “dianas celulares” sobre las que actúan los distintos agentes químicos a utilizar. Las principales son:

- a- **Pared celular:** es la encargada de proteger la integridad de los microorganismos y mantener en cierta forma su supervivencia. En ella se pueden encontrar ciertas sustancias como los lipolisacáridos y

fosfolípidos estabilizados por medio de iones de calcio (Ca^{++}) y magnesio (Mg^{++}). Estos elementos se integran a un grupo de proteínas y otras sustancias de acuerdo al microorganismo que integren. Por lo tanto para que un desinfectante pueda ser bien absorbido o repelido por la carga eléctrica de la membrana dependerá de su estado de disociación.

- b- **Membrana citoplasmática:** algunas sustancias simples pueden atravesar esta estructura lipoproteica por el mecanismo de difusión pasiva. Otras, utilizarán el transporte activo. La mayoría de los desinfectantes más utilizados en Odontología como los fenoles, los derivados del amonio cuaternario y las bisguanidas entre otros, producen fisuras a nivel de los compuestos de bajo peso molecular causando la desnaturalización proteica y la lisis celular.
- c- **Metabolismo energético:** ciertos desinfectantes actúan sobre el Adenosin Tri Fosfato (ATP) inhibiendo su síntesis. Por este motivo, se produce un desequilibrio de los procesos oxidativos y por ende se impide el suministro energético colapsando su metabolismo.
- d- **Citoplasma y núcleo:** algunos productos químicos interfieren a nivel enzimático o proteico, mientras que otros como los oxidantes o alquilantes pueden actuar sobre el ácido Ribonucleico (ARN) o desorribonucleico (ADN). En el primer caso inhiben la síntesis de proteínas y en el segundo alteran la reproducción celular.
- e- **Esporos:** ciertas bacterias poseen en su pared celular el ácido dipicolínico lo que genera una importante resistencia a los desinfectantes en comparación con las formas vegetativas. Algunos agentes químicos oxidantes como las formas cloradas son capaces de desestabilizar este compuesto en los esporos. Son pocos los desinfectantes con efecto esporicida, como sucede con los derivados de los amonio cuaternarios o fenoles. Sin embargo, pueden poseer un efecto sobre la viabilidad en algunos estadios del ciclo esporogénico de ciertas bacterias; siendo tres las áreas sobre las que pueden causar un efecto inhibitorio o letal:
 - Durante las diferentes fases de la esporulación.
 - Sobre el espora maduro como el glutaraldehído, formaldehído, hipoclorito de sodio y el dióxido de etileno.
 - Durante la germinación y/o el crecimiento. Ej fenoles y cresoles.

En los hongos el mecanismo de acción se relaciona selectivamente con la actividad enzimática y la pérdida de ergosterol en la membrana celular fúngica.

Sobre los virus el mecanismo de acción es más difícil de estudiar. Algunos desinfectantes pueden actuar sobre la envoltura lipídica como es el caso de herpesvirus, paramixovirus y orthomyxovirus ⁽³¹⁻³²⁾.

Los desinfectantes con propiedades lipofílicas son activos sobre las envolturas virales. El cloro, los derivados de yodo, los agentes oxidantes, el glutaraldehído, los ácidos y álcalis fuertes, son activos sobre la mayoría de los virus.

2.2.3-Inactivación y neutralización de los desinfectantes

Los antisépticos y desinfectantes son sustancias químicas capaces de eliminar los microorganismos patógenos. Para que esta acción sea eficaz se debe desarrollar en un breve periodo de tiempo y su acción debe ser bactericida. Para valorar la actividad de un antiséptico o desinfectante, se determina su concentración mínima bactericida (CMB). Para ello, los procedimientos más utilizados son los tests in vitro cuantitativos con microorganismos en suspensión y entre ellos el método de dilución-neutralización. Éste se aplica para la valoración de antisépticos y desinfectantes para los que son necesarios neutralizantes. **La CMB es la mínima concentración de desinfectante ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas (10^{-5}) una suspensión de bacterias en 5 minutos de contacto con el desinfectante a 20°C ⁽³³⁾. De acuerdo con las técnicas normalizadas (AFNOR 1997; AFNOR 1995) para el método de dilución-neutralización se parte de una suspensión bacteriana que debe contener entre 1×10^8 y 3×10^8 bacterias/ml ⁽³⁴⁾.**

2.3- Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio (NaClO) es un compuesto oxidante de rápida acción utilizado a gran escala para la desinfección de superficies, de equipos y de mesas de trabajo resistentes a la oxidación, de ropa hospitalaria y del agua. También, para descontaminar salpicaduras de sangre y eliminar olores. Los equipos o muebles metálicos tratados con cloro, tienden a oxidarse rápidamente en presencia de hipoclorito de sodio.

El hipoclorito de sodio es comercializado en una solución clara de ligero color verde-amarillento y un olor característico. Como agente blanqueante de uso doméstico normalmente contiene 5-6.5% de hipoclorito de sodio (con un pH de alrededor de 11, es irritante y corrosivo a los metales). Cuando el hipoclorito se mantiene en su envase a temperatura ambiente y sin abrirlo puede conservarse durante 1 mes. Al haberse utilizado para preparar soluciones se recomienda su cambio diario. Entre sus muchas propiedades se incluyen la amplia y rápida actividad antimicrobiana, relativa estabilidad, fácil uso y bajo costo.

El hipoclorito es letal para varios microorganismos, virus y bacterias vegetativas. Es menos efectivo contra esporas bacterianas, hongos y protozoarios. La actividad del hipoclorito se ve reducida en presencia de iones metálicos, biocapas, materiales orgánicos, bajo pH o luz UV. Las soluciones de trabajo deben ser preparadas diariamente. El cloro comercial que contiene 5-6% que será utilizado para la desinfección de superficies, debe ser diluído 1:10 para obtener una concentración final de aproximadamente 0.5% de hipoclorito. Cuando se quieren desinfectar líquidos que pueden contener material orgánico, debe prepararse una concentración final de 1% de hipoclorito ⁽³⁵⁻³⁶⁾. Al disponerse fácilmente de éste químico, se utiliza asiduamente en unidades hospitalarias. Los fabricantes presentan diferentes indicaciones y presentaciones respecto al producto.

Cualquier concentración puede ser utilizada para obtener una solución de hipoclorito diluída empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula: } \left(\frac{\% \text{ de hipoclorito de sodio concentrado}}{\% \text{ de hipoclorito de sodio deseado}} \right) - 1$$

$$\text{Ejemplo: } \left(\frac{4.5\%}{05\%} \right) - 1 = 9 - 1 = \mathbf{8 \text{ partes de agua por parte de Hipoclorito de sodio}}$$

Por ejemplo para preparar una solución 0.5% a partir de una 4.5% de hipoclorito de sodio se utilizarán 8 partes de agua con 1 parte de hipoclorito de sodio.

Donde "*parte*" puede ser utilizado para cualquier unidad de medida (litro, mililitro, galones u otros) como medidor puede emplearse una taza, frasco o cualquier envase. En países de habla francesa la cantidad de hipoclorito se expresa como "*grados de cloro*". Un grado de cloro = 0.3% de cloro activo ⁽³⁶⁾.

El cloro es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la tierra. No se encuentra en un estado libre en la naturaleza, pero existe en combinación con el sodio, potasio, calcio, y magnesio. En el cuerpo humano, los compuestos de cloro son parte de la defensa inmune no específica. Se generan por los neutrófilos a través de la cloración de mieloperoxidasa mediada por un compuesto nitrogenado o un conjunto de compuestos. El compuesto activo del hipoclorito es el cloro el cual en todas las soluciones de hipoclorito se denomina "cloro libre". El hipoclorito de sodio es el irrigante de elección durante los tratamientos de conductos radiculares debido a su eficacia contra los microorganismos patógenos y la degradación del material orgánico, tejido necrótico y efecto bactericida. Como irrigante en endodoncia se utiliza actualmente como solución en concentraciones que van del 1% al 5,25%,

entre las más comunes; aunque se han reportado concentraciones de hasta 10%. Las soluciones comerciales de 5,25% de NaClO son de uso frecuente ⁽³⁷⁾. Es un compuesto halogenado utilizado como un agente proteolítico no específico capaz de eliminar magnesio e iones de carbonato. Se han publicado efectos indeseables de la solución como el citotóxico (accidentes graves al ser inyectado en los tejidos vivos), corrosión del metal, olor desagradable y eliminación de la parte orgánica de la capa de barro dentinario. Tiene capacidad de penetración en los túbulos dentinarios de 77 a 300 micras. Hallazgos de distintos autores describen que el hipoclorito puede eliminar a los microorganismos en cuestión de segundos, incluso a bajas concentraciones. Otros autores mencionan tiempos considerablemente más largos para la muerte de las mismas especies.

Fue producido por primera vez en 1789 en Javel (Francia), haciendo pasar gas cloro a través de una solución de carbonato de sodio. El líquido resultante conocido como "Eau de Javel" o "agua de Javel" era una solución diluida de hipoclorito de sodio. Este proceso no fue muy eficiente y se buscaron métodos de producción alternativos.

Uno de los métodos implicó la extracción de cal clorada (conocido como polvo de blanqueo) con carbonato de sodio para producir bajos niveles de cloro disponible. Este método se utiliza habitualmente para producir soluciones de NaClO para su uso como un antiséptico hospitalario que se vende bajo los nombres comerciales "Eusol" y "solución de Dakin." El hipoclorito de sodio como una solución tamponada al 0,5% se recomendó para la irrigación de heridas durante la Primera Guerra Mundial.

El mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado y se da cuando se contactan las proteínas del tejido y el NaClO. En esta reacción en corto tiempo se forma formaldehído y nitrógeno. Los enlaces peptídicos se rompen para disolver las proteínas. Durante este proceso el hidrógeno en los grupos amino (NH) se sustituye por el cloro (NCl). La formación de cloraminas desempeñan un papel importante para la eficacia antimicrobiana. Por lo tanto, el tejido necrótico y el material purulento se disuelven. Así, el agente antimicrobiano puede alcanzar y limpiar mejor las áreas infectadas.

El NaClO también se utiliza comúnmente para desproteinizar tejidos duros en aplicaciones biomédicas. El hipoclorito de sodio actúa como un disolvente orgánico y de la grasa, degradando los ácidos grasos y transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol); reduciendo la tensión superficial de la solución restante (reacción de saponificación).

El hipoclorito de sodio neutraliza aminoácidos que forman agua y sal (reacción de neutralización). Con la salida de iones hidroxilos hay una reducción del pH. Cuando el cloro se disuelve en agua y está en contacto con la materia orgánica forma ácido hipocloroso. Este es un ácido débil que actúa como un oxidante.

El ácido hipocloroso (HClO) e hipoclorito (iones ClO) conducen a la degradación del aminoácido y a la hidrólisis, presenta acción antimicrobiana mediante la

inhibición de enzimas bacterianas que llevan a la oxidación irreversible de grupos SH (grupo sulfhidrilo) de las enzimas bacterianas esenciales.

La eficacia antimicrobiana del hipoclorito de sodio se da en base a su pH alto (11) (acción de iones hidroxilo). Siendo similar al mecanismo de acción del hidróxido de calcio. El alto pH de éste químico interfiere en la integridad de la membrana citoplasmática, con una inhibición enzimática irreversible, alteraciones en el metabolismo celular de biosíntesis y la degradación de fosfolípidos observados en la peroxidación lipídica.

A nivel odontológico, dentro de la cavidad bucal, el hipoclorito disuelve de manera efectiva restos de pulpa, colágeno y los principales componentes orgánicos de la dentina. Es el único irrigante del conducto radicular que disuelve el tejido necrótico orgánico y vital.

Este desinfectante tiene amplia actividad antibacteriana y se ha comprobado la efectividad contra los microorganismos más resistentes presentes en los conductos radiculares, como *Enterococo Faecalis* en concentración del 5.25%⁽³⁷⁾.

Otras cualidades del hipoclorito como irrigante se relacionan con: la baja tensión superficial, la neutralización de productos tóxicos en periodos cortos y su acción detergente y desodorizante. Juega un papel importante como agente antimicrobiano ya que libera oxígeno y cloro al entrar en contacto con el tejido pulpar⁽³⁸⁻³⁹⁾.

Con respecto a la acción antifúngica se ha comprobado que el hipoclorito de sodio tiene una alta capacidad de dilución frente a *Candida Albicans*. Este último residente de la familia de los hongos frecuentes en la cavidad bucal.

2.4- Monopersulfato de potasio

El monopersulfato de potasio (KHSO₅) está dentro del grupo de los compuestos peroxigenados. Se lo puede encontrar en la bibliografía con sinónimos como: persulfato potásico, peroxidisulfato de dipotasio, peroxidisulfato de potasio, sal dipotásica de ácido peroxidisulfúrico. El agente activo es el monopersulfato de potasio. En los productos comercializados se suman otros agentes auxiliares diseñados para potenciar la eficacia desinfectante y anticorrosiva.

La mayoría de los productos comerciales, contienen un tensioactivo que brinda al producto características de limpiador, permitiendo que el desinfectante actúe. La acción se da por oxidación de las diferentes estructuras bacterianas, que conlleva a la muerte celular⁽⁴⁰⁾.

El monopersulfato es un desinfectante de amplio espectro, que de acuerdo a la clasificación del CDC (Center for Disease Control and Prevention - Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) es un desinfectante de hospital, de nivel intermedio y activo frente a bacterias, hongos y algunos virus.

Este agente está aprobado por la EPA (Environmental Protection Agency - agencia de protección del medio ambiente de EEUU) como desinfectante de hospital. En

octubre de 2006 fue aprobado por el mismo organismo como desinfectante efectivo contra gran cantidad de microorganismos ⁽⁴¹⁾.

La presentación del producto está integrada por un polvo, (monopersulfato de potasio) y un líquido con tensioactivos. Para reconstituirlo y llevarlo a su forma activa se debe disolver una medida de polvo y una de líquido en agua potable. De esta manera permanece activo por un periodo de tiempo que varía de acuerdo a las normas del fabricante.

La formulación de monopersulfato de potasio no es corrosiva para el aluminio, zinc, acero al carbono, carburo de tungsteno, acero inoxidable, acero cromado, cloruro de polivinilo, policarbonato, polietileno, polipropileno, compuestos de neopreno, silicona, látex y nylon rígido. Esto se ha logrado con el agregado de ingredientes activos que disminuyen o anulan los efectos corrosivos y la inactivación frente a la materia orgánica ⁽⁴²⁾.

En cuanto al almacenamiento, deben evitarse la humedad, el calor y la luz directa sobre el producto preparado o sin preparar.

Atento al marco referencial y a la existencia de incógnitas respecto al tema a abordar se han planteado los objetivos y la metodología atinente a la consecución de los mismos.

3- Objetivos:

3.1- Objetivo general:

Estudiar y comparar la acción microbicida del monopersulfato de potasio y el hipoclorito de sodio sobre los cinco microorganismos más frecuentes en ambientes odontológicos.

3.2- Objetivos específicos

- Aplicar el método dilución- neutralización.
- Analizar la acción microbicida del monopersulfato de potasio sobre los cinco microorganismos más habituales en ambientes odontológicos.
- Evaluar el comportamiento del hipoclorito de sodio sobre los cinco microorganismos más comunes en ambientes odontológicos.
- Comparar las ventajas y desventajas de ambos agentes químicos desinfectantes.
- Optimizar la utilización del monopersulfato de potasio y el hipoclorito de sodio.
- Transferir los resultados al campo de la Bioseguridad.

3.3- Hipótesis:

El monopersulfato de potasio tendría una acción microbicida superior al hipoclorito de sodio frente a los microorganismos más habituales de los ambientes odontológicos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *el Aspergillus fumigatus*).

4- Materiales y Método:

4.1- Diseño metodológico:

Este trabajo se enmarca en una investigación básica y aplicada. El diseño metodológico fue experimental y de tipo transversal. La línea de investigación aportaría conocimientos a las áreas de microbiología y bioseguridad, como así también a otras áreas de la ciencia odontológica. Para el logro de los objetivos propuestos en este estudio se trabajó “In- Vitro” con el método de dilución-neutralización. Con éste último se analizó el efecto microbicida del hipoclorito de sodio (NaClO) y del monopersulfato de potasio (KHSO₅) sobre los microorganismos que con mayor frecuencia se presentan en ambientes odontológicos.

Las muestras seleccionadas correspondieron a cuatro especies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* (n=4) y a una especie fúngica *Aspergillus fumigatus* (n=1).

En cada unidad muestral se consideraron las siguientes variables: la suspensión bacteriana, el desinfectante y el neutralizante.

4.2- Estudio y comparación de desinfectantes sobre microorganismos.

Con el objetivo de estudiar y comparar la acción microbicida del monopersulfato de potasio y el hipoclorito de sodio fueron seleccionados y activados los cinco microorganismos antes mencionados y que son frecuentes en ambientes odontológicos.

4.2.1- Activación de cepas bacterianas:

Las cepas originales criopreservadas utilizadas en este trabajo, fueron suministradas por el Cepario de la Asignatura Microbiología Clínica, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Entre ellas se seleccionaron: *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15442; *Acinetobacter baumannii*, ATCC 17978 y *Escherichia coli*, ATCC 11229. Las mismas fueron activadas en caldo nutritivo (Britania) [ver ítem 4.2.1.a] e incubadas en estufa a 37 ° durante 18-24 horas.

4.2.1.a- Caldo nutritivo:

Componentes:

- 8 gramos de polvo (pluripeptona + Extracto de carne).

- 1000 ml de agua destilada.

Preparación:

Se colocaron 0.5 gramos (gr.) de polvo de caldo nutritivo en 50 mililitros (ml.) de agua destilada, (en una relación de 8 gramos de polvo en un litro de agua destilada, de acuerdo a las especificaciones del fabricante).

Luego fueron seleccionados 10 tubos de ensayo a los que se les colocó 5 ml de caldo nutritivo. Los mismos fueron esterilizados en autoclave a presión de vapor con un régimen de 120°, durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión como se observa en la figura 1.

Todos los elementos utilizados bajo la presentación “polvo”, fueron pesados en balanza digital marca OHAUS CS Series y en balanza analítica marca Precisa XB220A, tal como se muestra en las figuras 2 y 3.



Figura 1. Autoclave Eléctrico Arcano de 16 litros.



Figura 2 . Balanza digital Ohaus CS series perteneciente a la Asignatura Microbiología. FCE- UNLP.



Figura 3. Balanza analítica marca Precisa XB220A, perteneciente a la Asignatura Microbiología. FCE-UNLP.

Posteriormente, se realizaron con el mismo intervalo de tiempo y temperatura 2 pases de cultivo en la superficie de un tubo de agar mantenimiento (inclinado). [ver ítem 4.2.1.b].

4.2.1.b- Agar mantenimiento:

Componentes:

- Agua destilada estéril, 1000 ml.
- Peptona tríptica de caseína, 15gr. (Microquín SRL).
- Peptona de soja, 5 gr. (Britania).
- Cloruro de sodio, 5 gr. (Biopack).
- Agar, 15 gr. (Britania).



Figura 4. La flecha roja continua señala los tubos con el agar mantenimiento inclinado.

Preparación:

Los componentes se disolvieron en ebullición dosificándolos con pipetas automáticas (THERMO SCIENTIFIC) en tubos de ensayo, colocando 10 ml por tubo. A continuación se esterilizaron en autoclave con presión de vapor durante 20 minutos, a

120° de temperatura y a una atmósfera de presión. Transcurrido el ciclo los tubos fueron inclinados para su solidificación, obteniendo el agar en pico de flauta (Fig. 4).



Figura 5. Pipeta automática, Marca Thermo Scientific.
Capacidad máxima 10ml.

4.3- Preparación de la suspensión de ensayo:

Del último cultivo desarrollado sobre la superficie del agar inclinado se procedieron a tomar 5 microlitros (ul) con un ansa de Kollé en anillo previamente desinfectada con la llama de un mechero, los que se incorporaron en otro tubo con 10 ml de diluyente (ver ítem 4.3.1), homogeneizándolo durante 10 – 15 segundos (seg.) con un agitador tipo Vórtex (fig. 6).



Figura 6. Agitador de tubos tipo Vórtex. Marca Th-Rbell.

4.3.1- Diluyente:

Componentes:

- Peptona de caseína, 1 gr. (Microquin SRL)
- Cloruro de sodio, 8,5 gr. (Biopack)
- Agua destilada, 1000 ml.



Figura 7. La flecha roja continua indica la presencia de diluyente dentro del tubo.

Preparación:

El diluyente preparado con los componentes químicos mencionados anteriormente fue disuelto en ebullición para luego ser esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120° de temperatura y a una atmósfera de presión.

Posteriormente, con una pipeta automática (THERMO SCIENTIFIC), se retiró 1 ml de la solución anterior, y fue colocada en una cubeta para espectrofotómetro con un centímetro (cm) de paso de luz (Fig. 8).

En otra cubeta se introdujo 1 ml de la sustancia diluyente sin la carga orgánica (blanco).

Una vez obtenidas las 2 cubetas se ajustó la suspensión bacteriana, calibrando en 620 nanómetros (nm) el espectrofotómetro marca Helios (Fig. 9).



Figura 8. Cubeta para espectrofotómetro Thermo (electron corporation) modelo Heλios.



Figura 9. Espectrofotómetro Heλios, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

4.3.2- Medición de la densidad óptica por espectrofotometría:

La cubeta fue ubicada en el espectrofotómetro con el diluyente (blanco); se presionó el botón “SOCKET” hasta que llegue a cero y luego se colocó la cubeta con la suspensión bacteriana para medir la densidad óptica (D.O). La misma debía presentar los siguientes valores de observancia:

- 0.3-0.4 para Cocos Gram positivos.
- 0.2-0.3 para Bacilos Gram negativos.

Una vez ajustada la suspensión de ensayo, ésta debía poseer un rango de $1-3 \times 10^8$ bacterias/ ml.

A partir de ésta suspensión bacteriana, se prepararon diluciones seriadas de acuerdo a la siguiente tabla y figura:

4.3.3- Diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en diluyente.

Nº de tubo	1	2	3	4	5	6
Suspensión bacteriana en diluyente(ml)	400 µl en 3.6 ml	800 µl en 3.2 ml	200 µl en 3.8 ml			

Tabla 1. Se describe la cantidad de suspensión bacteriana en diluyente de acuerdo al número de tubo.

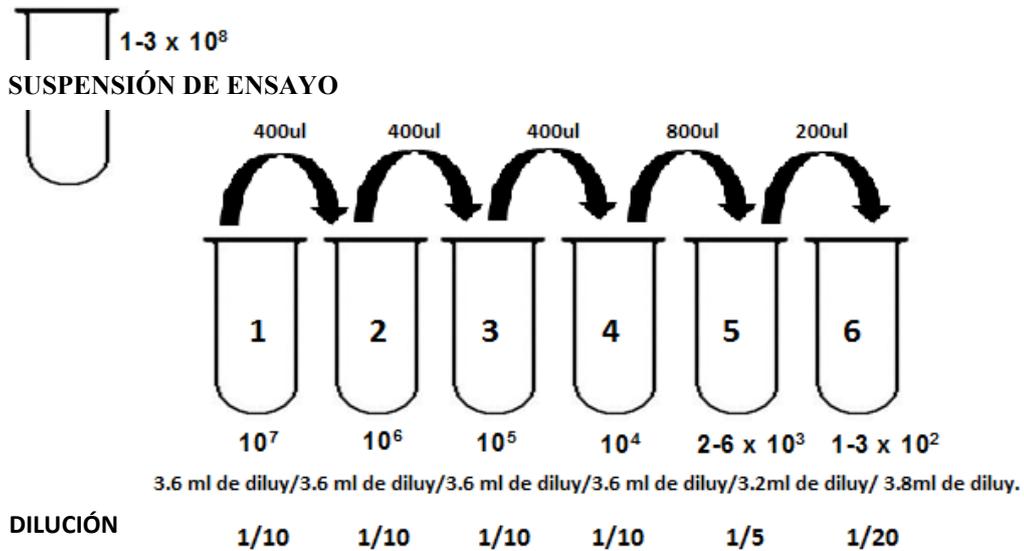


Figura 10. Se observan los tubos, la cantidad de diluyente y sus diluciones a partir de la solución de ensayo.

Tal como indica la tabla 1 y la figura 10, se utilizaron 6 tubos de ensayo numerados del 1 al 6 con diluyente y suspensión bacteriana. A continuación se procedió a realizar la dilución. Del tubo con la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$) se extrajeron 400 ul colocándolos en el tubo 1. Del tubo 1 se retiraron 400 ul inoculándolos en el segundo tubo; continuando de igual forma en los tubos 3 y 4. Del tubo 4 se extrajeron 200 ul colocándolos en el tubo 5. De éste último 800 ul se trasvasaron al tubo nº 6. Cada uno de los tubos fue homogenizado en agitador tipo vortex durante 10-15 segundos.

La suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$) y los tubos 5 ($2-6 \times 10^3$) y 6 ($1-3 \times 10^2$) se conservaron. El resto de los tubos se desecharon.

Por otro lado se fundió en ebullición (Fig.11) un matraz de Erlenmeyer con agar recuento (ver ítem 4.3.4) y se mantuvo a 50°C .



Figura 11. Baño termostático Vicking.
Modelo Masson. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.

4.3.4- Agar recuento:

Componentes:

- Extracto de levadura, 2.5 gr. (Britania).
- Peptona tripsica de caseína, 5 gr. (Microquín SRL).
- Glucosa, 1 gr. (Parafarm).
- Agar, 15 gr. (Britania).
- Agua destilada, 1000 ml.

Preparación:

Los elementos mencionados se disolvieron en ebullición y esterilizados en autoclave con los mismos ciclos citados anteriormente.

Todos los ensayos realizados (preparación de las suspensiones bacterianas, de los desinfectantes y neutralizantes) fueron realizados bajo una campana de flujo laminar con condiciones de bioseguridad clase 2, cumpliendo con los criterios de desempeño de: 1) US Standard ANSI/NSF 49:2002, 2) European Standard EN13469:2000, 3) Chinese Standard YY0569-2005.



Figura 12. Campana de flujo laminar vertical Marca BIOBASE.

4.4- Recuento de las bacterias obtenidas en la última dilución:

Del tubo 6 se extrajo con una pipeta (Fig. 13), 1ml de la suspensión bacteriana que fue colocado en una placa de Petri por duplicado (Fig. 14), luego se vertió agar recuento (ver ítem 4.3.4), invirtiendo las placas que se incubaron a 37° C por un lapso de 18-24 horas según la cepa.



Figura 13. Pipeta automática Marca Eppendorf con una capacidad máxima de 1000 ul.

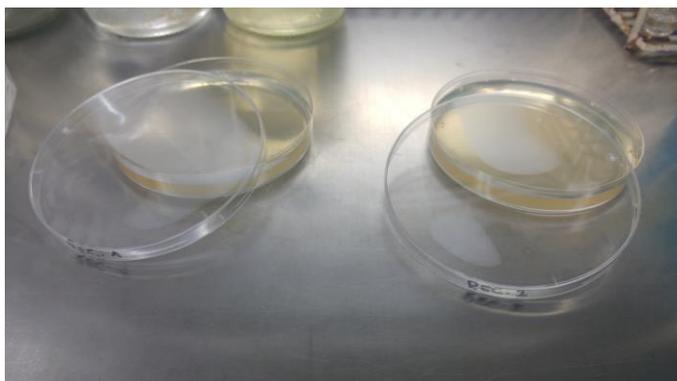


Figura 14. Se evidencian 2 placas de Petri 90/15 (Massobact) con agar recuento y suspensión bacteriana.

4.5- Ensayo microbicida del Hipoclorito de sodio y el Monopersulfato de potasio.

Para verificar la acción de los 2 desinfectantes seleccionados (NaClO y KHSO_5), se utilizó la suspensión de ensayo mencionada en el ítem 4.3.2. De la misma, se extrajeron $100 \mu\text{l}$ que fueron vertidos en un tubo de ensayo con $900 \mu\text{l}$ del desinfectante a ensayar (Monopersulfato de potasio o Hipoclorito de sodio). Posteriormente, se agitó en vórtex manteniéndolo durante 5 minutos a 20°C . Transcurrido ese tiempo se extrajeron $250 \mu\text{l}$ que fueron añadidos en un tubo con 2.25 ml de neutralizante a concentración simple (1X). Se agitó y conservó durante 10 minutos a 20°C .

Posteriormente se extrajo 1 ml con pipeta que fue colocado en una placa de Petri (proceso que se hizo por duplicado), se vertió agar recuento mezclando bien antes de su solidificación. Las placas fueron invertidas, incubándolas a 37°C por un lapso de 18-24 hs según la cepa.

4.5.1- Preparación de los desinfectantes y neutralizantes.

DESINFECTANTE	PREPARACION DEL DESINFECTANTE	SE NEUTRALIZA CON	PREPARACION DEL NEUTRALIZANTE
MONOPERSULFATO DE POTASIO.	Para 1 litro: En un litro de agua colocar un sobre de polvo activo de 5 gr. y luego la solución activadora 20 ml. (fig. 15).	Bicarbonato de sodio (Virkon).	$2,5 \text{ gramos}$ de bicarbonato de sodio en 100 ml de agua destilada. Agitar en vórtex y autoclavar.

<p>HIPOCLORITO DE SODIO</p>	<p>Lavandina concentrada 60 gr. de cloro activo/ml.</p> <p>Preparación con pipeta: 0,90 ml de agua y 0,10 ml de hipoclorito de sodio. (fig. 16)</p>	<p>Tiosulfato de sodio</p>	<p>1 gramo de tiosulfato de sodio en 10 ml de agua destilada. Agitar en vórtex y autoclavar.</p>
------------------------------------	---	----------------------------	--

Tabla 2. Preparación del monopersulfato de potasio e hipoclorito de sodio y sus neutralizantes. Indicaciones.



Figura 15. Solución preparada de Monopersulfato de potasio.

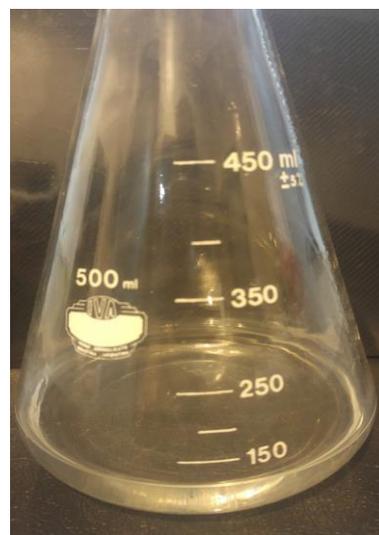


Figura 16. Hipoclorito de sodio preparado.

4.5.1.a- Preparación del neutralizante a concentración simple (1X):

Para comprobar la acción microbicida del desinfectante, debió ser neutralizado a una temperatura y tiempo determinado (ítem 4.5) a concentración simple (1X), correspondiendo el tiosulfato de sodio para el hipoclorito y el bicarbonato de sodio para el monopersulfato de potasio.

Para preparar el primer neutralizante se utilizó 1 g. disuelto en 10 ml de agua destilada, mientras que para preparar al segundo se requirió 0.1 g. disuelto en 10 ml de agua destilada.

4.5.1.b- Procedimiento para el ensayo del Neutralizante:

Para realizar el ensayo con el neutralizante se tomaron dos tubos, uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio o monopersulfato de potasio a concentración 1/5.

Luego se colocó en cada tubo 1 ml del neutralizante correspondiente para cada desinfectante a doble concentración (2X). Se agitó en vórtex manteniéndolo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron agregados 100 µl de la suspensión bacteriana número 5 (ver ítem 4.3.3) con pipeta Thermo Scientific (fig. 17). Se agitó y conservó a 20° C durante 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (ya que también se hizo por duplicado). Se vertió agar recuento mezclando bien antes de su solidificación. Las placas invertidas fueron incubadas a 37° C por un lapso de 18-24 horas según la cepa.



Figura 17. Pipeta Automática marca Thermo Scientific.
Capacidad máxima 200 ul.

4.5.1.c- Preparación del neutralizante a doble concentración (2X):

Para comprobar la acción del neutralizante sobre los distintos desinfectantes, se utilizó cada uno a doble concentración (2X). Es decir, 2 gramos de Tiosulfato de sodio en 10 ml de agua destilada, para ensayar el hipoclorito de sodio y 0,2 gramos de bicarbonato de sodio en 10 ml de agua destilada, para ensayar el monopersulfato de potasio.



Figura 18. Tubos de ensayo con los neutralizantes en sus distintas concentraciones.

4.6- Ensayo de la suspensión fúngica:

Para la prueba de dilución-neutralización en hongos, se emplea la misma técnica utilizada para bacterias con algunas modificaciones a saber:

4.6.1- Activación de la cepa fúngica.

En este caso se utilizó solución de esporas y agar papa inclinado.

4.6.1.a- Solución de esporas:

Componentes:

- 100 ml de agua destilada.
- 1 gr. de glucosa. (Parafarm).
- 1 gr. de sodio lauril sulfato. (Difco TM).

Preparación:

Los componentes fueron disueltos en ebullición, dosificando 9 ml por tubo. Luego, se esterilizaron en autoclave de Chamberland durante 20 minutos a 120° de temperatura a una atmósfera de presión.

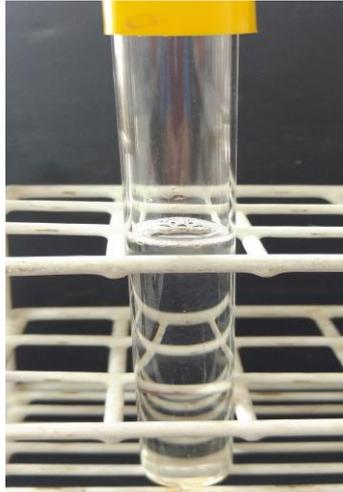


Figura 19. Solución de esporas dentro de un tubo de ensayo.

4.6.1.b- Agar papa:

Componentes:

- 100 ml de agua destilada.
- 3.9 gr. De agar papa. (HiMedia Laboratories).

Preparación:

Una vez dosificados los componentes se disolvieron en ebullición para dosificar 7 ml por tubo de ensayo. La esterilización fue realizada en autoclave con el mismo ciclo mencionado en el ítem 4.6.1.a, para luego inclinarlos en forma de pico de flauta (fig. 20).

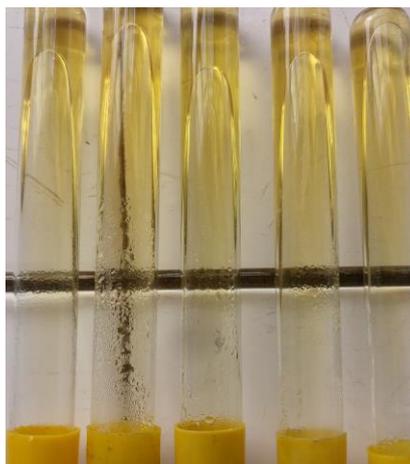


Figura 20. La fotografía indica la presencia de Agar papa inclinado en forma de pico de flauta.

4.6.2- Pasos previos a la Técnica:

Una vez desarrollado *Aspergillus fumigatus* en la superficie del agar papa inclinado (fig.21-22), fueron incorporados 9 ml de la solución de esporas, raspando con ansa en anillo estéril suavemente para favorecer el desprendimiento de los conidios. Una vez realizado este proceso, se homogenizó en vórtex durante 10-15 segundos, obteniendo una solución de conidios.

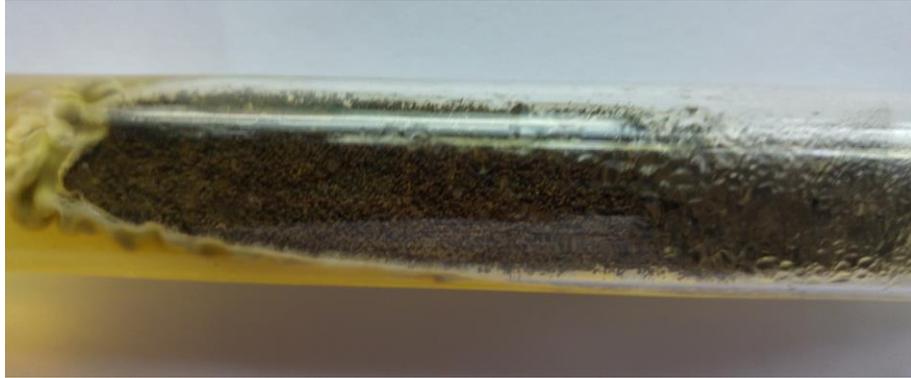


Figura 21. *Aspergillus fumigatus* en Agar papa inclinado. Vista 1.

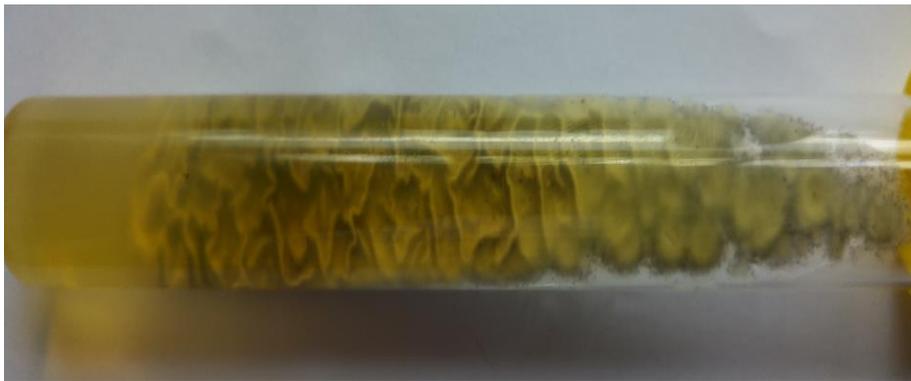


Figura 22. *Aspergillus fumigatus* en Agar papa inclinado. Vista 2.

Luego, en un Eppendorf se colocó 0.50 ul de la solución de conidios y 0.50 ul de azul tripan (fig. 23) para inmediatamente, homogenizar en vórtex durante 10- 15 segundos.

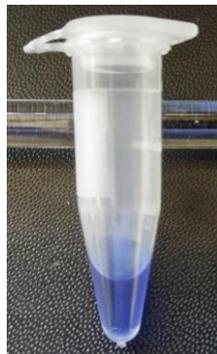


Figura 23. Tubo Eppendorf con Azul Tripan y Solución de conidios.

Posteriormente fueron colocados 20 μ l de la solución de conidios en la cámara de Neubauer (Fig. 24) para su recuento. El mismo se realizó con microscopía óptica, contabilizando los 16 cuadrantes y su contrario (fig. 25). Procedimiento que reemplaza a la espectrofotometría realizada en bacterias para establecer la densidad óptica (D.O).



Figura 24. Cámara de Neubauer para recuento de conidios.

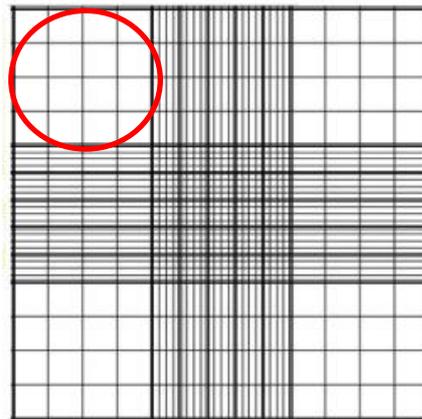


Figura 25. Esquematización de la cámara de Neubauer con sus cuadrantes. El círculo rojo indica el sector de 16 cuadrantes.

4.7- Prueba de dilución y neutralización de desinfectantes sobre microorganismos presentes en ambientes odontológicos.

Para realizar la prueba de dilución - neutralización fue necesario ensayar a las suspensiones bacterianas y/o fúngicas, a los desinfectantes y a los neutralizantes (ver tabla).

SUSPENSIONES BACTERIANAS Y/O FÚNGICAS	ENSAYO DEL DESINFECTANTE	ENSAYO DEL NEUTRALIZANTE
1- <i>Staphylococcus aureus</i>	A- Monopersulfato de potasio B- Hipoclorito de sodio	A- Bicarbonato de sodio B- Tiosulfato de sodio
2- <i>Escherichia coli</i>	A- Monopersulfato de potasio B- Hipoclorito de sodio	A- Bicarbonato de sodio B- Tiosulfato de sodio
3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A- Monopersulfato de potasio B- Hipoclorito de sodio	A- Bicarbonato de sodio B- Tiosulfato de sodio
4- <i>Acinetobacter baumannii</i>	A- Monopersulfato de potasio B- Hipoclorito de sodio	A- Bicarbonato de sodio B- Tiosulfato de sodio
5- <i>Aspergillus fumigatus</i>	A- Monopersulfato de potasio B- Hipoclorito de sodio	A- Bicarbonato de sodio B- Tiosulfato de sodio

Tabla 2: Indica las suspensiones bacterianas/fúngicas, los desinfectantes ensayados y sus respectivos neutralizantes.

4.7.1- Prueba de dilución/neutralización del Monopersulfato de potasio sobre *S. aureus*.

Para este ensayo fue utilizada una cepa de *S. aureus* de colección ATCC 6538.

La obtención de la cepa y su activación fue realizada de acuerdo al (ítem 4.2.1).

En el último pase de cultivo fue realizada la coloración de Gram Kopeloff para corroborar, en este caso, la presencia de un microorganismo Gram positivo. (ítem 4.7.1.a)

4.7.1.a- Coloración de Gram: (Britania)

Componentes:

- Violeta de Genciana.
- Lugol concentrado.
- Decolorante (alcohol acetona).
- Safranina.



Figura 26. Elementos necesarios para la realización de la coloración de Gram.

Técnica:

- Toma de muestra: realizada con un ansa de Kofle desinfectada.
- Extendido: en la parte central de un portaobjetos limpio y desengrasado se colocó una alícuota de la cepa bacteriana.
- Fijación: a través del método de Koch, que consiste en pasar tres veces el portaobjeto con la muestra sobre la llama de un mechero.
- Aplicación del colorante primario (violeta de genciana) durante 20 segundos.
- Lavado con agua durante 10 segundos.
- Colocación del mordiente (lugol) durante 30 segundos. Dicho producto tiene como función intensificar la acción del colorante primario. Lavado por 10 seg
- Decoloración: realizada con alcohol acetona. Para este paso es importante hacer una leve presión en el envase plástico para lograr un chorro fino que arrastre el colorante primario. Lavado con agua durante 10 segundos.
- Aplicación del colorante secundario (safranina) durante 20 segundos.
- Lavado, secado y observación por microscopía óptica.

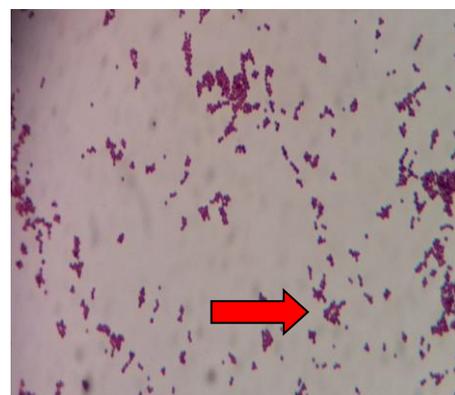
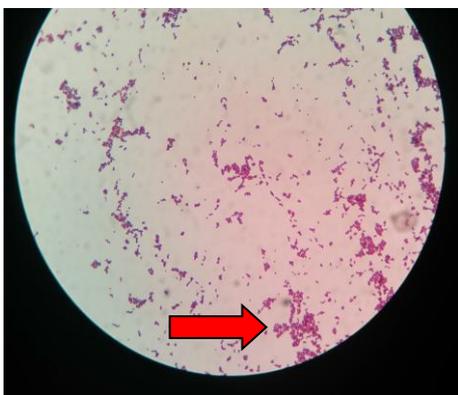


Figura 27 y 28. En las microfotografías puede evidenciarse a los *Staphylococcus aureus*. a través de la colocación de Gram. La flecha roja continua, indica la agrupación característica del *S. aureus* observado por microscopía óptica.

Posteriormente, se extrajeron 5 μ l (con un asa en anillo) de la cepa desarrollada en el último pase de cultivo colocándola en otro tubo con 10 ml de diluyente. Se homogenizó en vórtex ajustando en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia: D.O (densidad óptica)= 0.304.

4.7.1.b- Ensayo de las suspensiones bacterianas con *Staphylococcus aureus*.

Para la realización de este ensayo fueron efectuadas las diluciones de acuerdo al (ítem 4.3.3). Se retiró 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo N° 6 colocándola en una placa de Petri (por duplicado) y vertiendo agar recuento. Realizada esta operación, se invirtieron las placas incubándolas a 37° C por un lapso de 18 hs para efectuar el recuento consecutivamente.

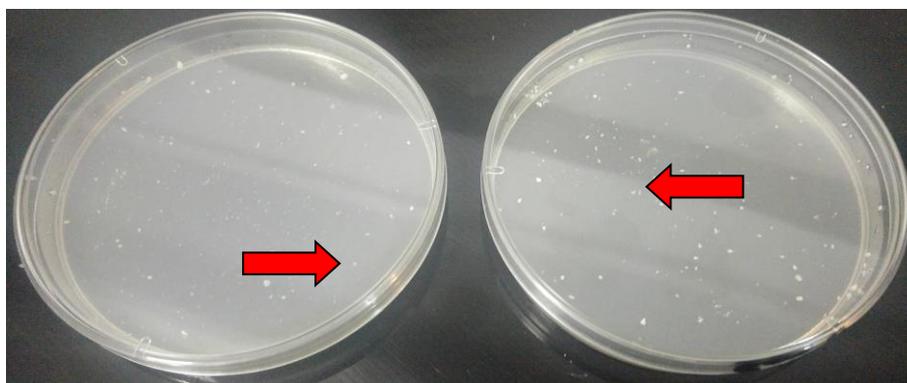


Figura 29 . Desarrollo de *Staphylococcus aureus* sobre placas con agar recuento.
La flecha roja continua evidencia el desarrollo del Microorganismo.

4.7.1.c- Ensayo del desinfectante (Monopersulfato de potasio):

Del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) se extrajeron 100 μ l que fueron introducidos en un tubo con 900 μ l de Monopersulfato de potasio. Se homogenizó en vórtex manteniendo durante 5 minutos a 20 ° C; 250 μ l fueron añadidos en un tubo con 2.25 ml de bicarbonato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó y mantuvo durante 10 minutos a 20° C, para luego extraer 1 ml y plaquearlo en agar recuento por duplicado. Las placas fueron incubadas en forma invertida a 37° C por un lapso de 18 horas para efectuar el recuento.

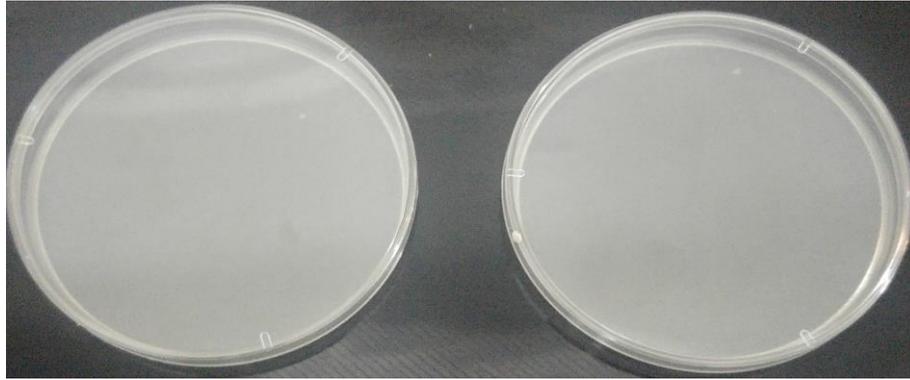


Figura 30 . En la fotografía se muestran placas con agar recuento, monopersulfato de potasio y su neutralizante en concentración (1X).

4.7.1.d- Ensayo del neutralizante (Bicarbonato de sodio):

Para realizar la prueba de efectividad del neutralizante, se emplearon dos tubos, uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de monopersulfato de potasio a concentración 1/5.

En cada tubo fue colocado 1 ml de Bicarbonato de sodio a doble concentración (2X) agitando en vórtex y manteniéndolos a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente se agregaron 100 µl de la suspensión bacteriana número 5 en cada tubo, los cuales fueron homogenizados y mantenidos a 20° C durante 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo se tomaron dos alícuotas de 1ml sembrándolas en placas de Petri con agar recuento. Este paso fue repetido una vez más en igualdad de condiciones con ambos tubos incubándolos durante 18 horas a 37° C.

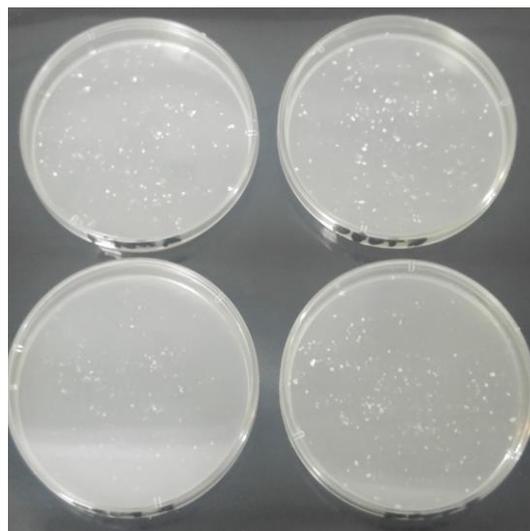


Figura 31. En la imagen pueden observarse a las dos placas superiores con agua destilada estéril, bicarbonato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5, mientras que en las dos placas inferiores, monopersulfato de potasio 1/5, bicarbonato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5.

4.7.2- Prueba de dilución/neutralización del hipoclorito de sodio sobre *S. aureus*.

Para dicho ensayo se utilizó, una cepa de colección ATCC 6538 activada de acuerdo al (Item 4.2.1).

Efectuado el último repique se aplicó la coloración de Gram Kopeloff para corroborar la presencia de la cepa.

A continuación, se extrajeron 5 ul del último repique que fueron colocados en otro tubo de ensayo con 10 ml de diluyente. Esta preparación fue homogenizada en vórtex y ajustada en espectrofotómetro para observar la densidad óptica: D.O (densidad óptica)= 0.321.

4.7.2.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con *Staphilococcus aureus*.

Luego de realizar las diluciones como se menciona en el ítem 4.3.3, se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 colocándola en una placa de Petri (proceso que se hizo por duplicado) para inmediatamente verter agar recuento. Realizada esta operación se invirtieron las placas e incubaron a 37° C durante 18 hs para hacer recuento.

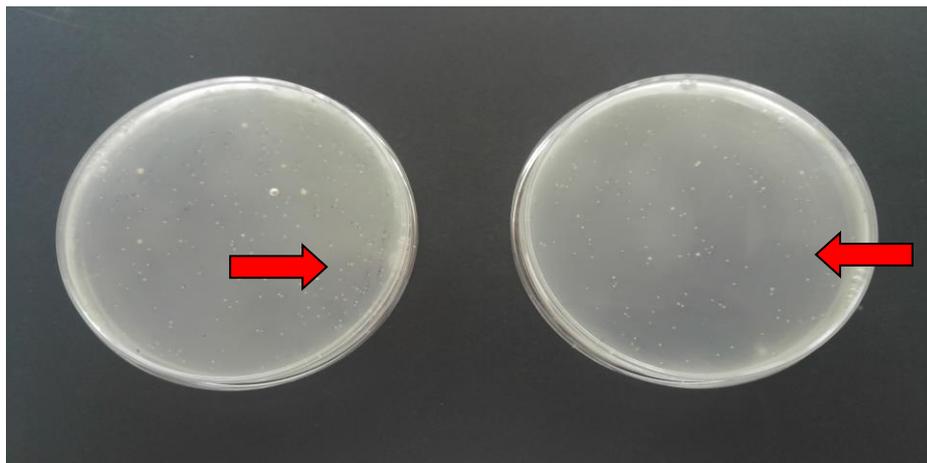


Figura 32. La imagen digital muestra al *Staphilococcus aureus*, desarrollado sobre placas con agar recuento. La flecha roja continua evidencia el desarrollo del Microorganismo.

4.7.2.b- Ensayo del desinfectante (Hipoclorito de sodio):

Para evaluar la acción bactericida del hipoclorito de sodio se extrajeron 100 ul de la suspensión de ensayo extravasándolos a otro tubo con 900 µl de Hipoclorito de sodio, homogeneizando en vórtex a 20 ° C durante 5 minutos.

Cumplimentado el tiempo, 250 µl se añadieron en un tubo con 2.25 ml de Tiosulfato de sodio a concentración simple (1X), agitando en vórtex y dejando reposar durante 10 minutos a 20° C; para luego extraer 1 ml y sembrarlo por duplicado en agar recuento. Las placas fueron incubadas en forma invertida a 37° C. A las 18 horas se efectuó el recuento.

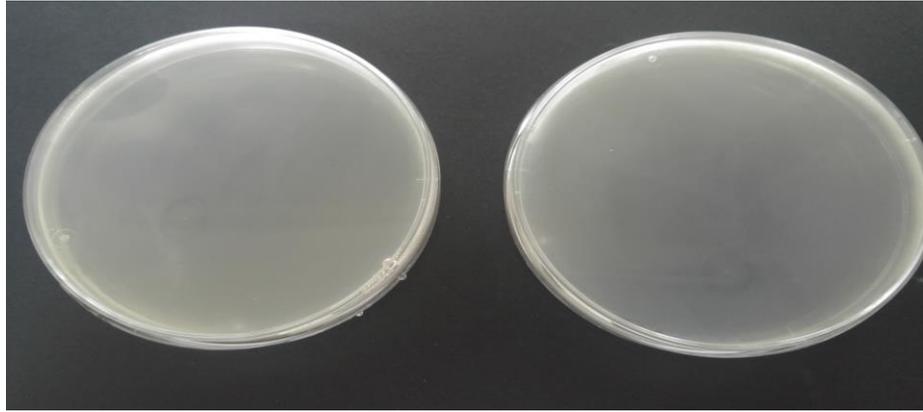


Figura 33 . Placas con agar recuento, hipoclorito de sodio y Tiosulfato de sodio en concentración (1X).

4.7.2.c- Ensayo del Neutralizante (Tiosulfato de sodio):

Con dos tubos se evaluó la efectividad del tiosulfato de sodio: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio a concentración 1/5. En cada tubo fue colocado 1 ml de Tiosulfato de sodio a doble concentración (2X). Se homogenizó en vórtex manteniendo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron incorporados 100 μ l de la suspensión bacteriana número 5, homogeneizando y conservando 5 minutos a 20°C. Cumplidos los minutos estipulados se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (ya que cada uno de ellos se hizo por duplicado) colocando en placas con agar recuento. Las placas fueron cultivadas de modo invertido con un régimen de 37° C durante 18 horas, para luego realizar el recuento.

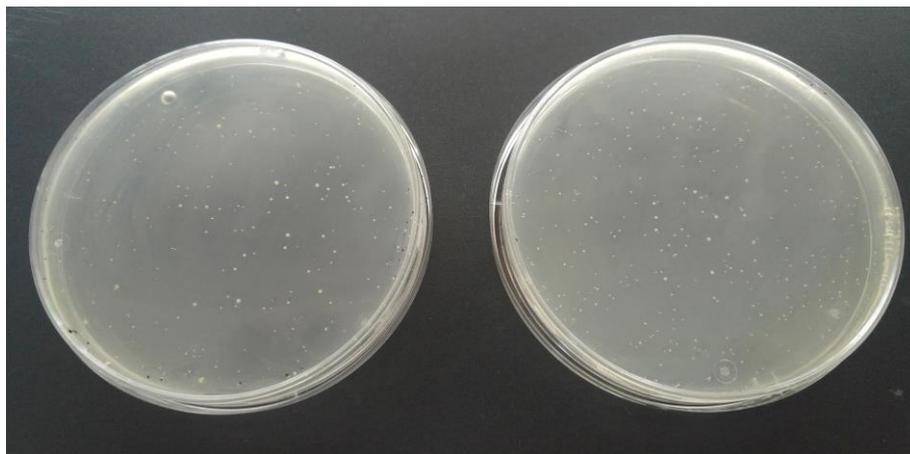


Figura 34. La imagen presenta 2 placas con agua destilada, Tiosulfato de sodio (2X) y suspensión bacteriana N°5.

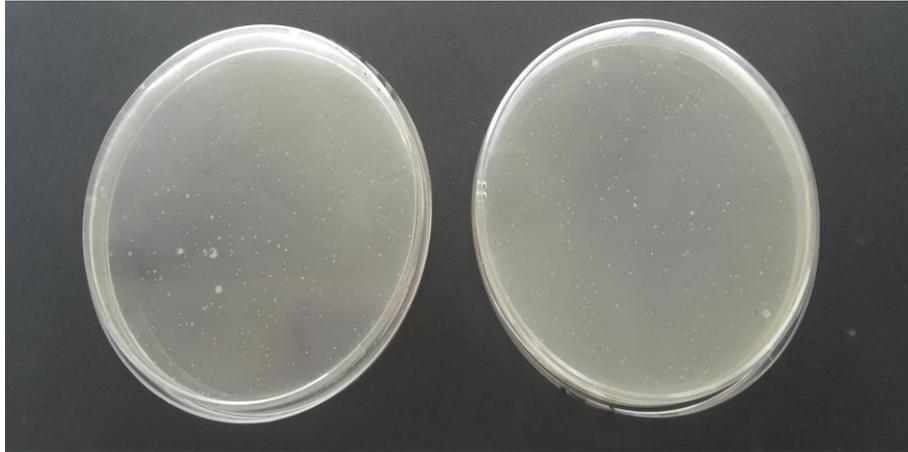


Figura 35 . En la fotografía pueden observarse 2 placas con hipoclorito de sodio 1/5, Tiosulfato de sodio (2X) y suspensión bacteriana N°5.

4.7.3- Prueba de dilución/neutralización del Monopersulfato de potasio sobre *Escherichia coli*.

Para este ensayo fue utilizada una cepa de colección ATCC 11229. La obtención de la cepa y su activación fue realizada de acuerdo al ítem 4.2.1. Con el tubo del último pase de cultivo fue efectuado un nuevo cultivo en placa con Agar EMB (medio de cultivo usado para el aislamiento y diferenciación de *E. coli*). (Fig. 36).

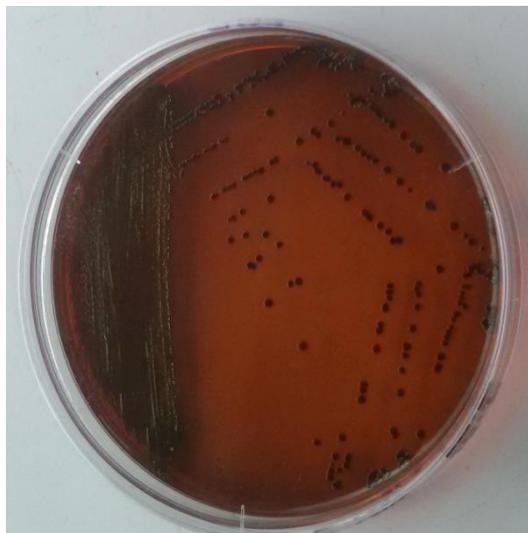


Figura 36. Imagen del desarrollo de *E. coli* sobre Agar EMB.

También se aplicó la coloración de Gram Kopeloff para corroborar la presencia de bacilos gram negativos (ítem 4.7.1.a), (fig. 37-38).

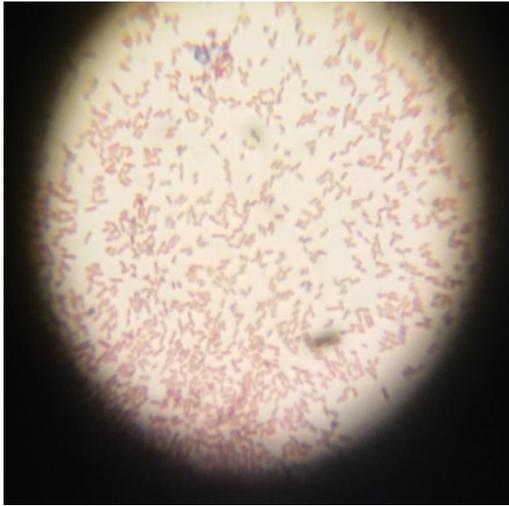


Figura 37 . En la microfotografía se observan bacilos Gram negativos.

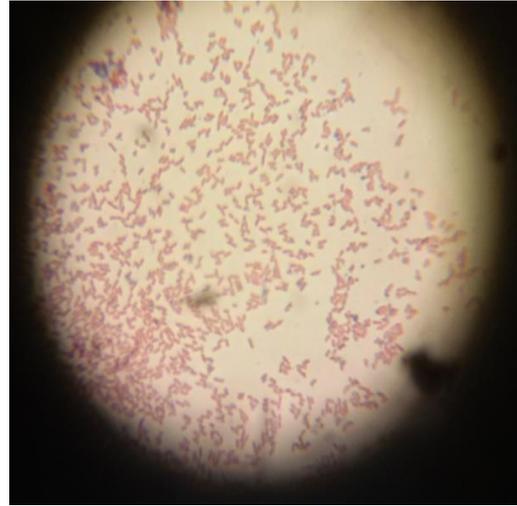


Figura 38 . Imagen similar a la anterior de bacilos Gram negativos.

Posteriormente, se extrajeron del tubo del último pase de cultivo 5 ul de la cepa de *E. coli* con un ansa de Kolle colocándolo en otro tubo de ensayo con 10 ml de diluyente. Inmediatamente se homogenizó en vórtex ajustando en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia:

D.O (densidad óptica)= 0.217.

4.7.3.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas:

Luego de realizar las diluciones como se menciona en el ítem 4.3.3, se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 colocándola en una placa de Petri (proceso que se hizo por duplicado) e incorporando sobre su superficie agar recuento. Fue realizada la homogenización para proceder al cultivo de las placas durante 18 horas a 37 ° C y efectuar el recuento.

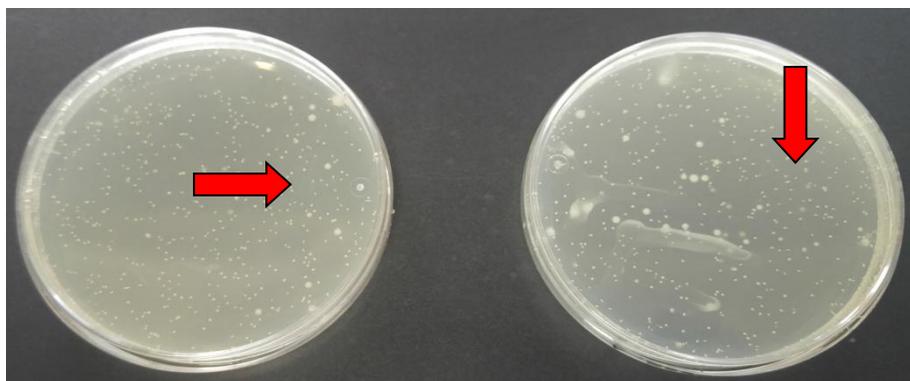


Figura 39 . En la microfotografía se observa la presencia de *E. coli*, sobre placas con agar recuento. La flecha roja continua evidencia el desarrollo del Microorganismo.

4.7.3.b- Ensayo del desinfectante (Monopersulfato de potasio):

Del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) fueron extraídos 100 μ l que se introdujeron en un tubo con 900 μ l de Monopersulfato de potasio. La homogenización fue realizada en vórtex manteniendo a 20 ° C durante 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo se extrajeron 250 μ l que fueron colocados en un tubo con 2.25 ml de bicarbonato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó y dejó durante 10 minutos a 20° C, para luego extraer 1 ml y plaquearlo en agar recuento por duplicado. Las placas fueron incubadas en forma invertida a 37° por un lapso de 18 horas para posteriormente efectuar el recuento.

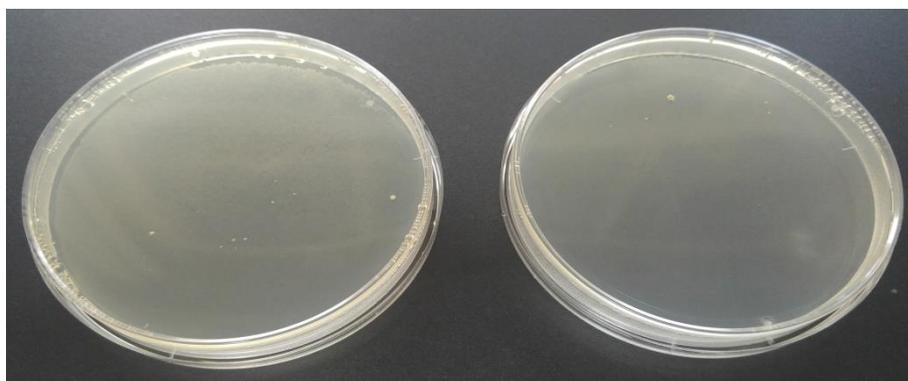


Figura 40. La imagen muestra 2 placas con monopersulfato de potasio, neutralizante (1X) y *E. coli* en agar recuento.

4.7.3.c- Ensayo del Neutralizante (bicarbonato de sodio):

Para efectuar esta prueba se utilizaron dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de monopersulfato de potasio a concentración 1/5.

En cada tubo fue colocado 1 ml de bicarbonato de sodio a doble concentración (2X), agitando en vórtex y manteniendo a 20° C durante 10 minutos. Luego, fueron agregados 100 μ l de la suspensión bacteriana número 5 en cada tubo homogenizando y manteniendo a 20° C durante 5 minutos. Se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (cada uno por duplicado) que se sembraron en placas de Petri vertiendo agar recuento y mezclando bien antes de su solidificación. Las placas fueron incubadas a 37° C por un lapso de 18 horas. Posteriormente fue realizado el recuento.

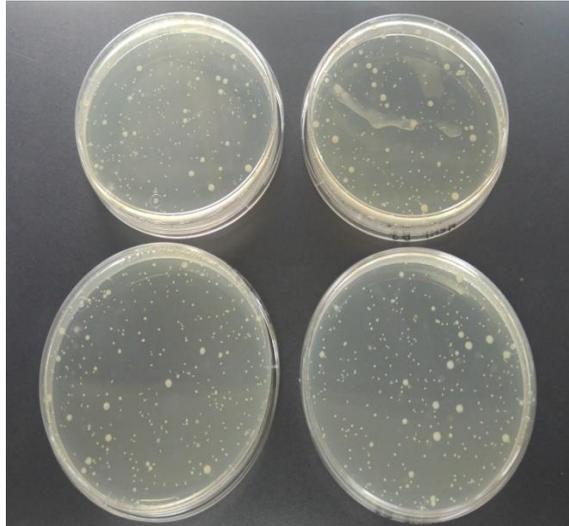


Figura 41 . En la parte superior de la fotografía se observan dos placas con agua destilada estéril, bicarbonato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5. El sector inferior, muestra dos placas con monopersulfato de potasio 1/5, bicarbonato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5.

4.7.4- Prueba de dilución/neutralización del Hipoclorito de sodio sobre *Escherichia coli*.

Nuevamente para ensayar *E. coli* fue utilizada una cepa de colección ATCC 11229. La obtención de la cepa y su activación fue realizada de acuerdo al (ítem 4.2.1). En el último pase de cultivo fue aplicada la coloración de Gram Kopeloff para corroborar la presencia de Gram negativos. A continuación, se extrajeron con un asa en anillo calibrada 5 ul del tubo del último pase de cultivo colocándolo en otro tubo con 10 ml de diluyente. Para la homogenización fue empleado un vórtex. Se ajustó en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia:

D.O (densidad óptica)= 0.224.

4.7.4.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas:

Una vez efectuadas las diluciones como se menciona en el ítem 4.3.3, se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 colocándolo por duplicado en placas de Petri, vertiendo agar recuento. Realizada esta operación fueron invertidas las placas e incubadas durante 18 horas a 37° C. Transcurrido ese periodo, se efectuó el recuento.

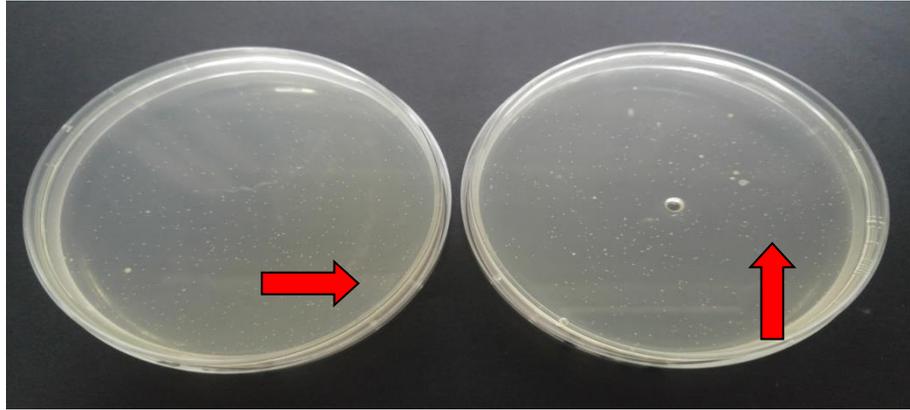


Figura 42. La flecha roja continua evidencia el desarrollo de *E. coli* en agar recuento.

4.7.4.b- Ensayo del desinfectante (Hipoclorito de sodio):

Para llevar a cabo ésta prueba, se procedió a tomar del tubo con la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) 100 μ l. Éstos últimos fueron introducidos en un tubo con 900 μ l de Hipoclorito de sodio homogenizando en vórtex, para posteriormente mantenerlo a 20 ° C durante 5 minutos. Cumplido ese lapso, se extrajeron 250 μ l de la suspensión anteriormente lograda y se añadieron en un tubo con 2.25 ml de Tiosulfato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó y dejó durante 10 minutos a 20° C, para luego extraer 1 ml, plaquarlo por duplicado e incubarlo. Luego las placas fueron invertidas durante 18 horas a 37 ° C, para proceder al recuento.

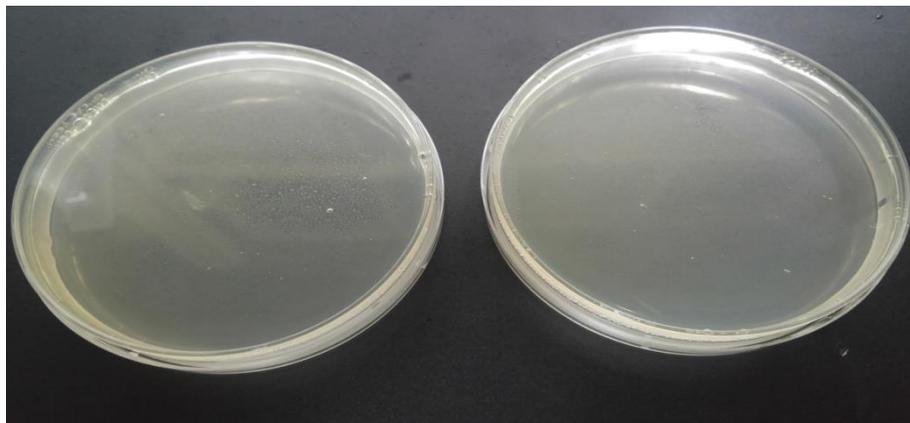


Figura 43. En la imagen se observan placas con agar recuento, suspensión de ensayo, hipoclorito de sodio y su neutralizante en concentración (1X).

4.7.4.c- Ensayo del Neutralizante (Tiosulfato de sodio):

Para proceder a la realización del ensayo del neutralizante fueron empleados dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio a concentración 1/5.

En cada tubo fue introducido 1 ml de Tiosulfato de sodio a doble concentración (2X). Se agitó en vórtex manteniéndolo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron incorporados 100 µl de la suspensión bacteriana número 5 homogenizando en vórtex. Realizada esta operación se mantuvo a 20° C durante 5 minutos. Cumplido ese tiempo, se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (cada uno por duplicado); vertiendo agar recuento y mezclando bien. Luego las placas fueron incubadas de forma invertida durante 18 horas a 37° C, para proceder al recuento.

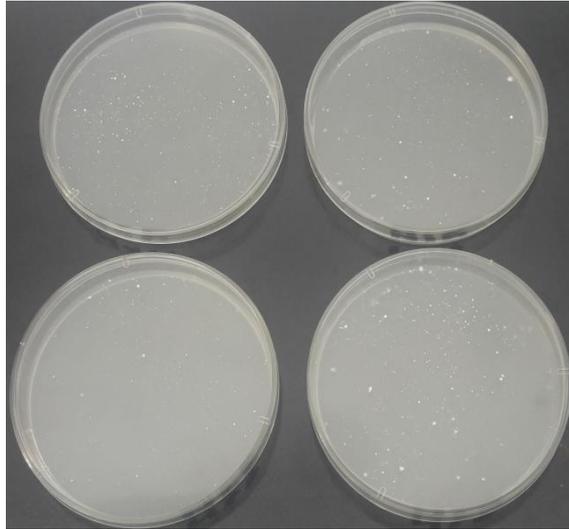


Figura 44 . En sector superior de la imagen se observan dos placas con agua destilada estéril, Tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5. El sector inferior muestra dos placas con hipoclorito de sodio 1/5, Tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5.

4.7.5- Prueba de dilución/neutralización del Monopersulfato de potasio sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Para este ensayo fue utilizada una cepa de colección ATCC 15442. La misma fue activada de igual manera que en el ítem 4.2.1. En el último repique fue realizada la coloración de Gram Kopeloff para corroborar la presencia de microorganismos gram negativos (Fig. 45-46).

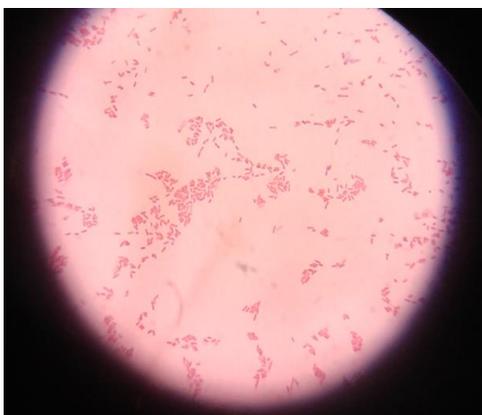


Figura 45. Microfotografía que evidencia la presencia de gran negativos. (Microscopia óptica)

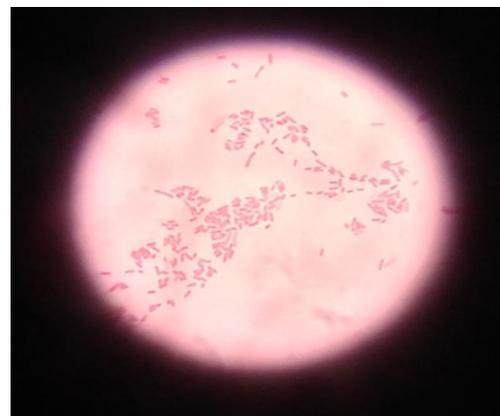


Figura 46. Microfotografía con presencia de Gram de gran negativos.

La cepa fue sometida a la luz UV para poder observar la fluorescencia, debido a la presencia de un pigmento característico (fluoresceína) producido por las *Pseudomonas* spp (fig.47).

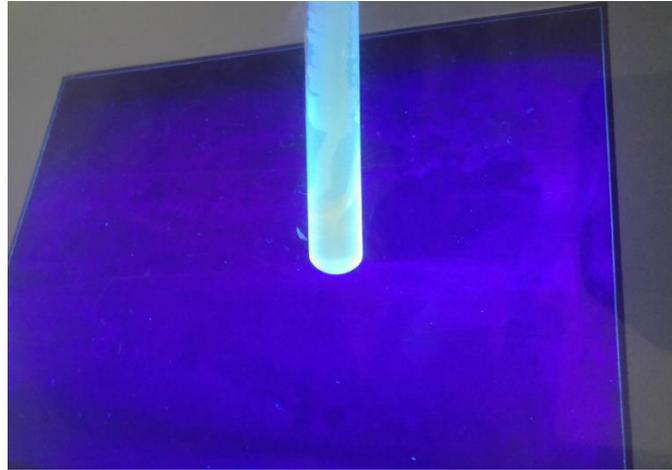


Figura 47. La Imagen muestra la fluorescencia de *P. aeruginosa* sobre luz ultravioleta.

Posteriormente, se extrajeron del tubo de ensayo con el último repique 5 ul de la cepa desarrollada con un ansa de Kolle. La misma fue colocada en otro tubo con 10 ml de diluyente, homogenizando en vórtex durante 15 segundos. Se ajustó en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia: D.O (densidad óptica)= 0.221.

4.7.5.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas:

Luego de realizar las diluciones como se menciona en el ítem 4.3.3, se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 que fue colocada en una placa de Petri (proceso que se hizo por duplicado). Luego se incorporó sobre su superficie agar recuento mezclando bien. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 18 horas. Transcurrido ese período se efectuó el recuento.

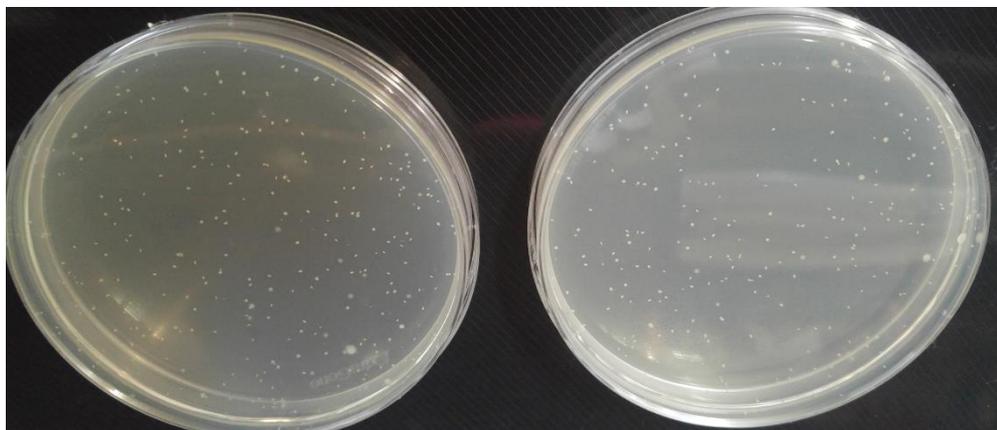


Figura 48 .En la imagen se observa el desarrollo de la *Pseudomona aeruginosa* sobre agar recuento.

4.7.5.b- Ensayo del desinfectante (Monopersulfato de potasio):

Del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) se extrajeron 100 μ l que fueron introducidos en un tubo con 900 μ l de Monopersulfato de potasio. Se homogenizó en vórtex manteniéndolo durante 5 minutos a 20 ° C.

Luego de ese período se extrajeron 250 μ l añadiéndolos en un tubo con 2.25 ml de bicarbonato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó y dejó durante 10 minutos a 20° C. De cada tubo fue extraído 1 ml para plaquearlo en agar recuento por duplicado. Las placas fueron incubadas en forma invertida a 37° por un lapso de 18 horas. Posteriormente se efectuó el recuento.

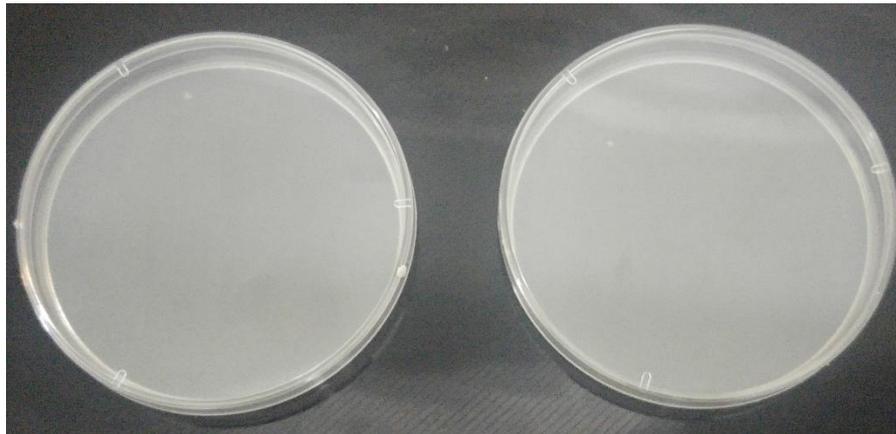


Figura 49 . En la fotografía digital se observa la acción del Monopersulfato de potasio con Neutralizante sobre *P. aeruginosa* en agar recuento (por duplicado).

4.7.5.c- Ensayo del Neutralizante (Bicarbonato de sodio):

Para ensayar al neutralizante fueron necesarios dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de monopersulfato de potasio a 1/5 de su concentración. En cada tubo fue colocado 1 ml de Bicarbonato de sodio a doble concentración (2X). Se agitó en vórtex y mantuvo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron incorporados 100 μ l de la suspensión bacteriana número 5, homogenizando y conservando a 20° C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo, repitiendo la misma operación hasta obtener un duplicado de cada tubo. Se vertió agar recuento mezclando bien antes de su solidificación, invirtiendo las placas e incubando a 37° C durante 18 hs, efectuando el recuento.

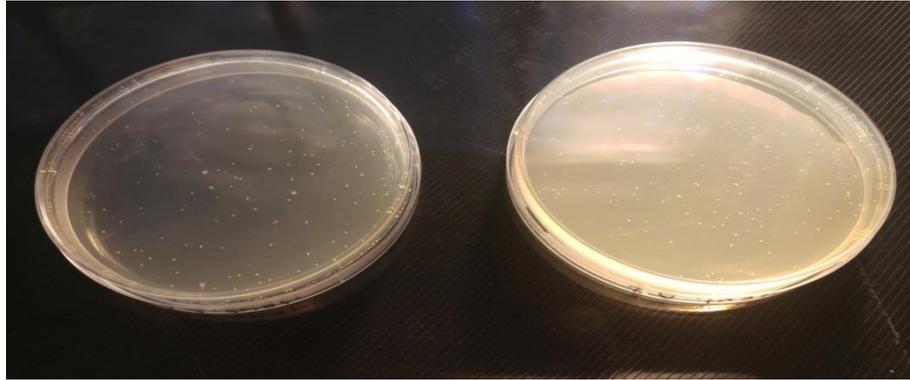


Figura 50. La fotografía digital evidencia el desarrollo de 2 placas con agua destilada, bicarbonato de sodio 2X y suspensión bacteriana del tubo 5.

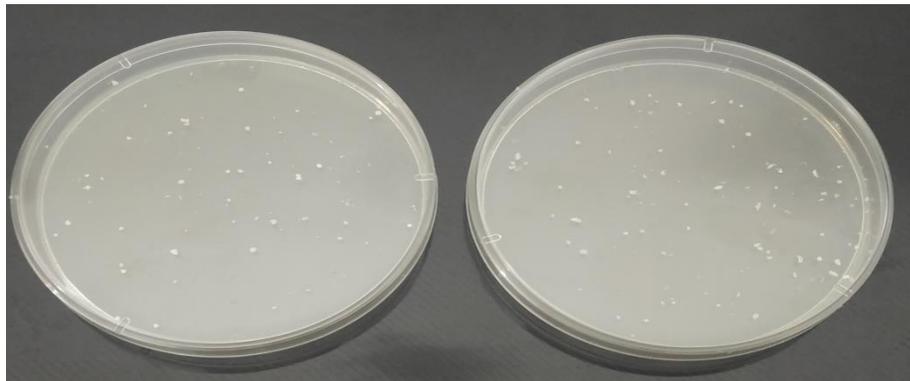


Figura 51. La fotografía evidencia el desarrollo de 2 placas con monopersulfato de potasio, bicarbonato de sodio 2X y suspensión bacteriana del tubo 5.

4.7.6- Prueba de dilución/neutralización del Hipoclorito de sodio sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Nuevamente para ensayar *P. aeruginosa* fue utilizada una cepa de colección ATCC 15442. La obtención de la cepa y su activación fue realizada como se menciona en el ítem 4.2.1. Con el tubo del último repique fue realizada la coloración de Gram para corroborar la presencia de bacilos gram negativos. Posterior a la tinción se extrajeron con un ansa de Kolle 5 ul del tubo de ensayo con el último repique, que se trasvasó a otro tubo con 10 ml de diluyente. Se homogenizó en vórtex durante 15 segundos y ajustó en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia:

D.O (densidad óptica)= 0.227.

4.7.6.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas:

Una vez efectuadas las diluciones como se menciona en el ítem 4.3.3, se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 colocando por duplicado en una placa de

Petri y vertiendo agar recuento. Realizada la operación se invirtieron las placas e incubaron a 37° C durante 18 horas para realizar el recuento.

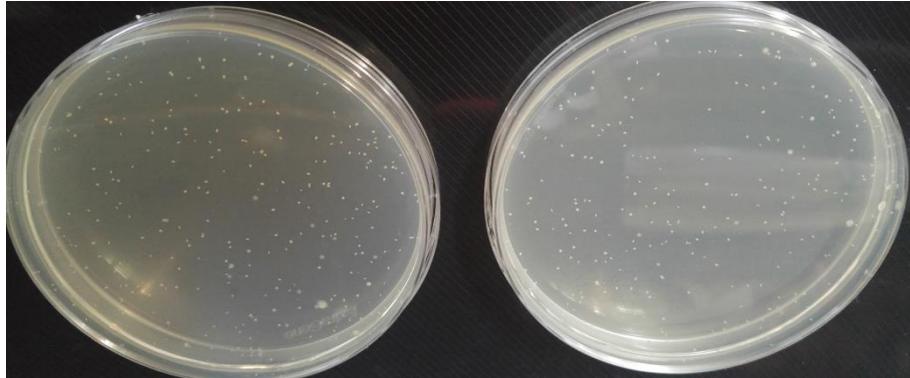


Figura 52. En la fotografía se observa el desarrollo de la *Pseudomonas aeruginosa* sobre 2 placas con agar recuento.

4.7.6.b- Ensayo del Desinfectante (Hipoclorito de sodio):

Para conocer el efecto bactericida de este desinfectante se extrajeron 100 µl del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml) y se introdujeron en un tubo con 900 µl de Hipoclorito de sodio, homogenizando en vórtex durante 5 minutos a 20 ° C. Luego de ese tiempo 250 µl fueron añadidos en un tubo con 2.25 ml de Tiosulfato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó y dejó durante 10 minutos a 20° C, para luego extraer 1 ml y plaquearlo por duplicado. Se vertió agar recuento mezclando bien antes de su solidificación. La incubación de las placas fue a 37° C durante 18 hs. de manera invertida para efectuar el recuento.

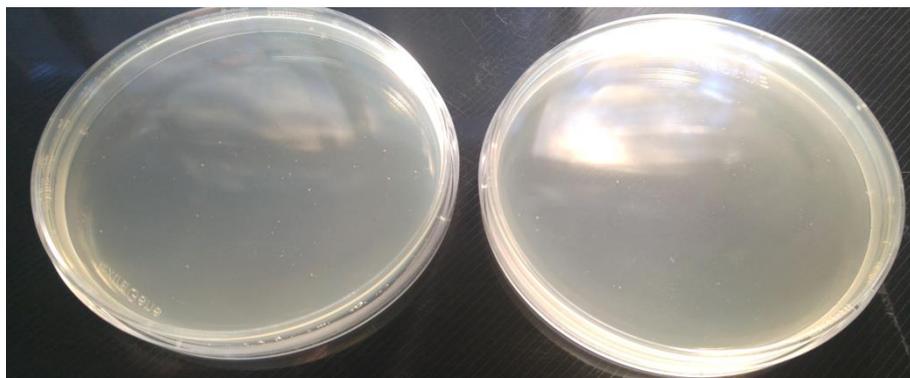


Figura 53. En la Imagen se observan placas con agar recuento, suspensión de ensayo, hipoclorito de sodio y su neutralizante en concentración (1X). (Los puntos observados en la placa 1, corresponden a burbujas)

4.7.6.c- Ensayo del Neutralizante (Tiosulfato de sodio):

Para conocer la efectividad del desinfectante, se emplearon dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio a concentración 1/5. En cada tubo fue añadido 1 ml de Tiosulfato de sodio a doble concentración (2X). Se agitó en vórtex y mantuvo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron incorporados 100 µl de la suspensión bacteriana número 5 homogenizando y manteniendo durante 5 minutos a 20° C. Cumplido ese lapso se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (cada uno se hizo por duplicado), vertiendo agar recuento y mezclando bien antes de su solidificación. Se invirtieron las placas e incubaron a 37° C por un lapso de 18 horas, para luego efectuar el recuento.

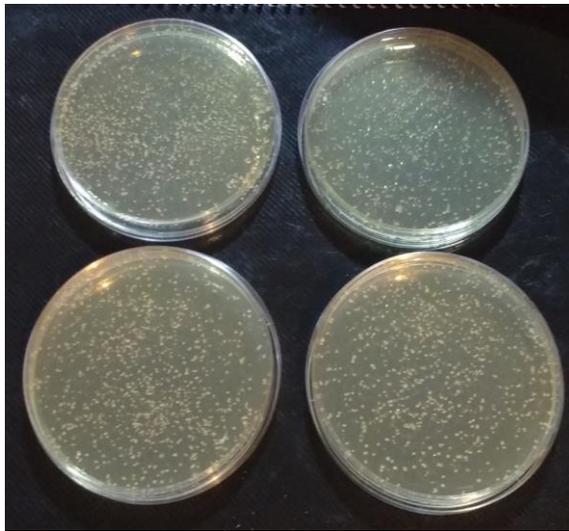


Figura 54 . En sector superior de la imagen se observan dos placas con agua destilada estéril, Tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5. El sector inferior, muestra dos placas con hipoclorito de sodio 1/5, Tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5.

4.7.7- Prueba de dilución/neutralización del Monopersulfato de potasio sobre *Acinetobacter baumannii*

Para este ensayo fue utilizada una cepa de colección ATCC 17978. La cepa fue obtenida y activada de acuerdo al (ítem 4.2.1). Con el tubo del último pase de cultivo fue realizado un nuevo cultivo en placa con Agar nutritivo.

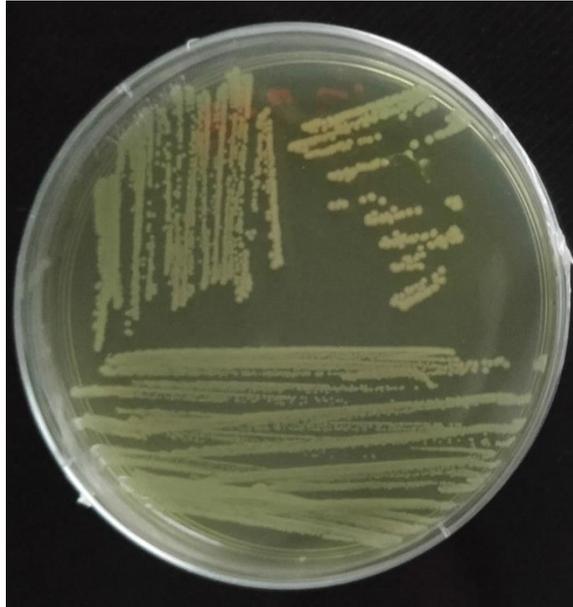


Figura 55. La imagen indica el desarrollo de *A. baumannii* sobre una placa de Agar

También, fue realizada la coloración de Gram Kopeloff para corroborar la presencia de bacilos gram negativos.

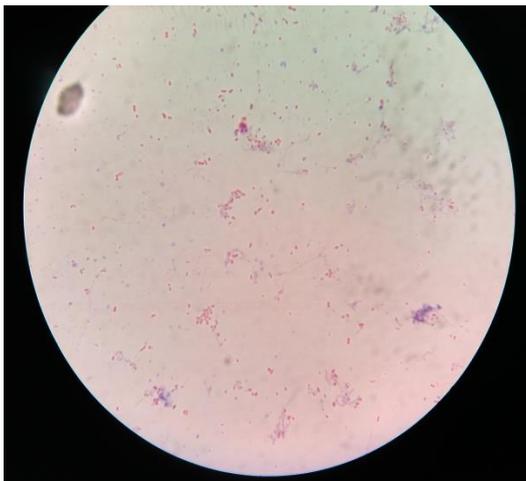


Figura 56. La Microfotografía obtenida por microscopia óptica muestra la presencia de Bacilos Gram negativos .



Figura 57. La flecha roja continua indica la presencia de Bacilos G-.

Posteriormente, se extrajeron del tubo del último pase de cultivo con un ansa de Kolle 5 ul de la cepa desarrollada. La misma fue inoculada en otro tubo con 10 ml de diluyente, homogenizando en vórtex y ajustando en espectrofotómetro hasta obtener el siguiente valor de observancia:

D.O (densidad óptica)= 0.211

4.7.7.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas:

Para efectivizar esta prueba fueron realizadas las diluciones de acuerdo al (ítem 4.3.3), Se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo N° 6 colocándola en una

placa de Petri (por duplicado) vertiendo agar recuento. Cumplida esta operación las placas fueron incubadas a 37° C por 18 horas de forma invertida para efectuar el recuento.

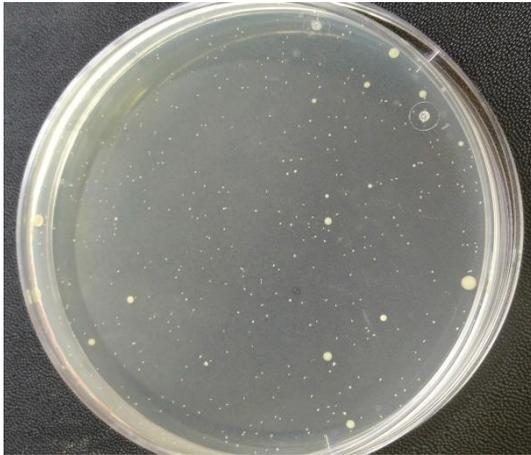


Figura 58. La imagen evidencia el desarrollo del *A. baumannii* sobre una placa de agar recuento.

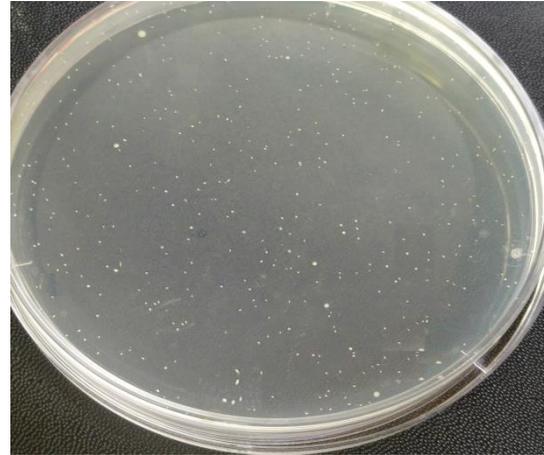
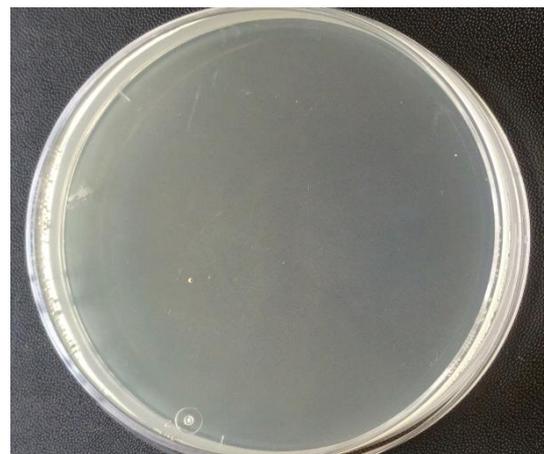


Figura 59. La imagen muestra el desarrollo *A. baumannii* sobre agar recuento (duplicado).

4.7.7.b- Ensayo del desinfectante (Monopersulfato de potasio):

Para conocer el efecto bactericida de este desinfectante se extrajeron 100 µl del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ bacterias/ml), estos fueron introducidos en un tubo con 900 µl de Monopersulfato de potasio. Se homogenizó en vórtex manteniendo durante 5 minutos a 20 ° C. Luego de ese tiempo 250 µl fueron añadidos en un tubo con 2.25 ml de bicarbonato de sodio a concentración simple (1X). Se agitó, dejando durante 10 minutos a 20° C para luego extraer 1 ml y plaquearlo por duplicado en agar recuento. La incubación fue realizada 37° C por 18 horas para efectuar el recuento.



Figuras 60 y 61 . En las imágenes se observa una placa con suspensión de ensayo, monopersulfato de potasio y bicarbonato de sodio (1X) con su respectivo duplicado.

4.7.7.c- Ensayo del Neutralizante (bicarbonato de sodio):

Para realizar la prueba de efectividad del neutralizante se tomaron dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de monopersulfato de potasio a concentración 1/5. En cada tubo fue colocado 1 ml de bicarbonato de sodio a doble concentración (2X) agitando en vórtex y conservándolo a 20° C durante 10 minutos. Luego fueron agregados 100 µl de la suspensión bacteriana número 5 en cada tubo, homogenizando y manteniendo a 20° C durante 5 minutos. Se tomaron dos alícuotas de 1ml de cada tubo (cada uno se hizo por duplicado), vertiendo agar recuento, mezclando bien antes de su solidificación. Se invirtieron las placas e incubaron a 37° C por un lapso de 18 hs. para efectuar el recuento.

4.7.8- Prueba de dilución/neutralización del Hipoclorito de sodio sobre *Acinetobacter baumannii*

Para éste ensayo se utilizó la cepa de colección ATCC 17978 que fue activada de acuerdo al (Item 4.2.1).

Posteriormente se extrajeron con ansa en anillo 5 ul del último repique colocándolos en otro tubo de ensayo con 10 ml de diluyente. Esta preparación fue homogenizada en vórtex ajustando en espectrofotómetro para observar la densidad óptica:
D.O (densidad óptica)= 0.208

4.7.8.a- Ensayo de las suspensiones bacterianas con *A. baumannii*.

Realizadas las diluciones mencionadas en el ítem 4.3.3 se extrajo 1 ml de la suspensión bacteriana del tubo 6 y fue colocada en una placa de Petri por duplicado; vertiendo inmediatamente agar recuento. Realizada esta operación se invirtieron las placas e incubaron a 37° C durante 18 hs efectuando el recuento.

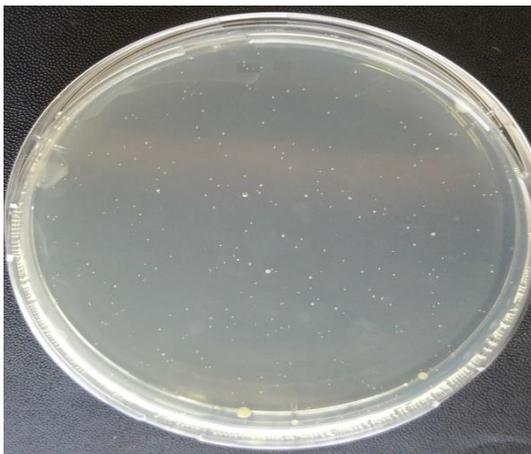


Figura 62. En la imagen digital se observa el desarrollo del *A. baumannii* en agar recuento.

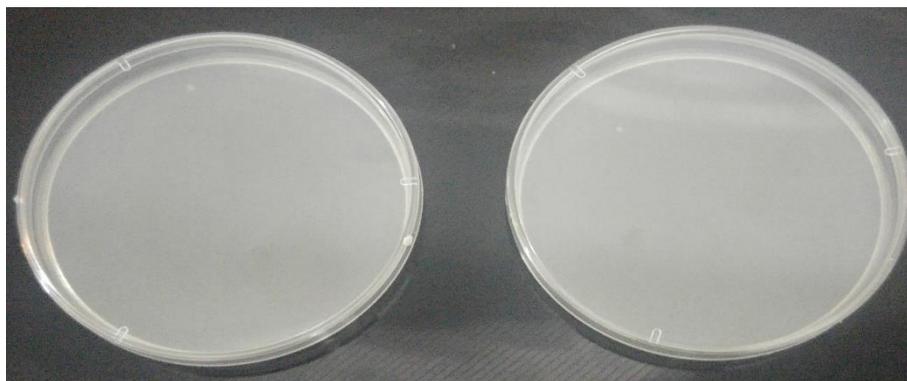


Figura 63. Esta imagen muestra el desarrollo del *A. baumannii* en agar recuento.

4.7.8.b- Ensayo del desinfectante (Hipoclorito de sodio):

Para evaluar la acción bactericida del hipoclorito de sodio se extrajeron 100 μ l de la suspensión de ensayo trasvasándolos a otro tubo con 900 μ l de Hipoclorito de sodio. La homogenización fue realizada en vórtex y se mantuvo a 20 ° C durante 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo se extrajeron 250 μ l que fueron incorporados en un tubo con 2.25 ml de Tiosulfato de sodio a concentración simple (1X) agitando en vórtex y manteniendo por 10 minutos a 20° C. Cumplimentado ese lapso, se tomó 1 ml que fue sembrado en placas con agar recuento. El proceso de incubación fue por 18 horas a 37° C. y se efectuó el recuento.



Figuras 64. En la microfotografía se observan 2 placas con agar recuento, suspensión de ensayo, hipoclorito de sodio y su neutralizante en concentración (1X). (Original y duplicado)

4.7.8.c- Ensayo del Neutralizante (Tiosulfato de sodio):

Con dos tubos se evaluó la efectividad del tiosulfato de sodio: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio a concentración 1/5, colocando en cada tubo 1 ml de Tiosulfato de sodio a doble concentración (2X). Se homogenizó en vórtex manteniendo a 20° C durante 10 minutos. Luego se agregaron 100 μ l de la suspensión bacteriana número 5. Continuando con los siguientes pasos: homogenización y reposo a 20° C durante 5 minutos; toma de dos alícuotas de 1ml por duplicado; colocación en placas con agar recuento; inversión de las placas en estufa de cultivo a 37° C durante 18 horas y recuento.

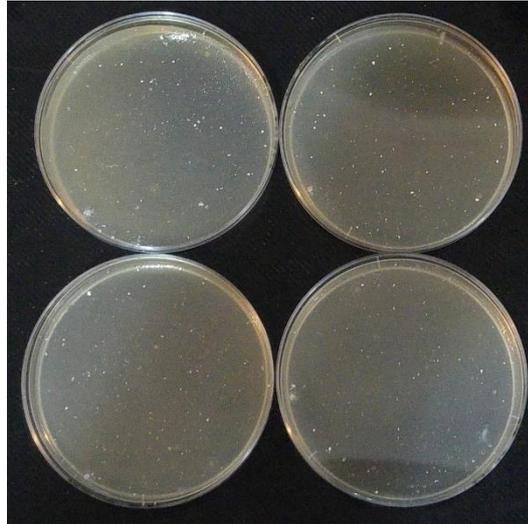


Figura 65 . En sector superior de la imagen pueden observarse dos placas con agua destilada estéril, tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5. El sector inferior muestra dos placas con monopersulfato de potasio 1/5, tiosulfato de sodio en concentración (2X) y suspensión bacteriana N° 5.

4.7.9- Prueba de dilución/neutralización del Monopersulfato de potasio sobre *Aspergillus fumigatus*.

Para la realización de esta prueba fue utilizada una cepa de colección ATCC 26934. A la misma se le realizaron 3 pases de cultivo con intervalos de 5 días. Al tubo con el último repique se lo trató de acuerdo al ítem 4.6.2. La suspensión fúngica fue ajustada mediante la utilización de la cámara de Neubauer (para recuento de conidios) y la microscopía óptica, considerando que el recuento obtenido debía alcanzar al igual que en el ensayo realizado con bacterias entre $1-3 \times 10^8$ conidios/ml (éste procedimiento reemplazaría al uso de espectrofotómetro mencionado en los ensayos con cepas bacterianas).

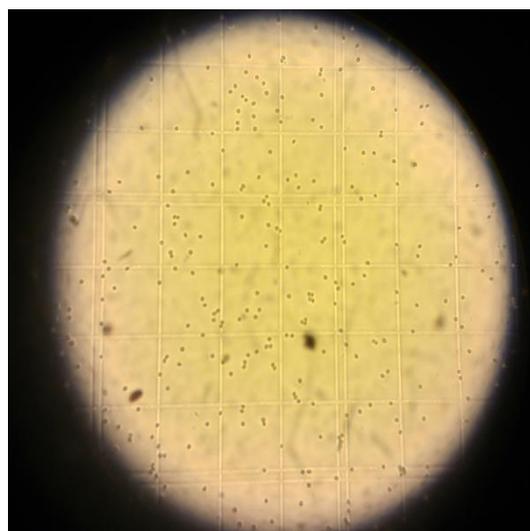


Figura 66. La microfotografía indica la disposición de conidios en la Cámara de Neubauer observados por Microscopía Óptica.

Posteriormente, se fundió en baño termostatzado un matraz de Erlenmeyer con agar recuento para preparar 8 placas de Petri (dos para el recuento, dos para el ensayo del desinfectante y cuatro para el neutralizante).

4.7.9.a- Ensayo de la suspensión fúngica:

Las diluciones fueron realizadas de acuerdo al (ítem 4.3.3). Se extrajeron 100 μ l de la suspensión fúngica del tubo N° 6 colocándolos sobre la superficie de una placa de Petri con agar recuento, homogenizando con perlas estériles. Este procedimiento se realizó por duplicado.

El método de siembra seleccionado se debió a que *A. fumigatus* es un hongo filamentoso aerobio estricto. Efectuada esta operación se incubaron las placas a 30° C por cinco días para consecutivamente efectuar el recuento.



Figura 67 . Presencia de Colonias de *A. fumigatus*



. Figura 68. Desarrollo de *A.fumigatus* (duplicado)

4.7.9.b- Ensayo del Desinfectante (Monopersulfato de potasio):

Para conocer el efecto fungicida del desinfectante se extrajeron 100 μ l del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ conidios/ml) colocándolos en un tubo con 900 μ l de monopersulfato de potasio. Los pasos siguientes fueron: homogenización en vórtex y mantenimiento durante 5 minutos a 20 ° C; extracción de 250 μ l e incorporación en un tubo con 2.25 ml de Bicarbonato de sodio a concentración simple (1X); mezcla y mantenimiento durante 10 minutos a 20° C; extracción de 100 μ l de la suspensión lograda; siembra en la superficie de una placa con agar recuento (por duplicado) con perlas estériles; inmediata incubación de las placas a 30° C por cinco días y recuento.

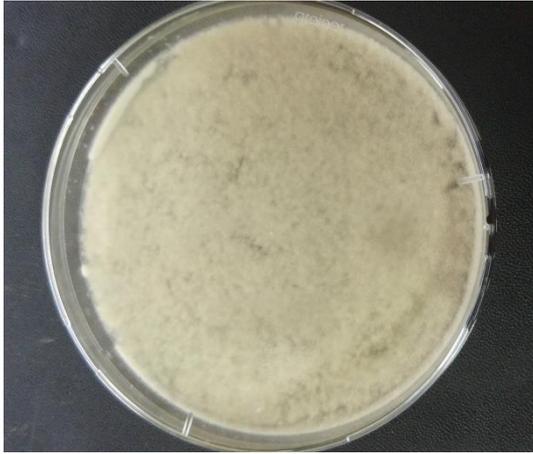


Figura 69. La fotografía digital muestra la presencia de *A. fumigatus* sobre una placa de agar recuento.

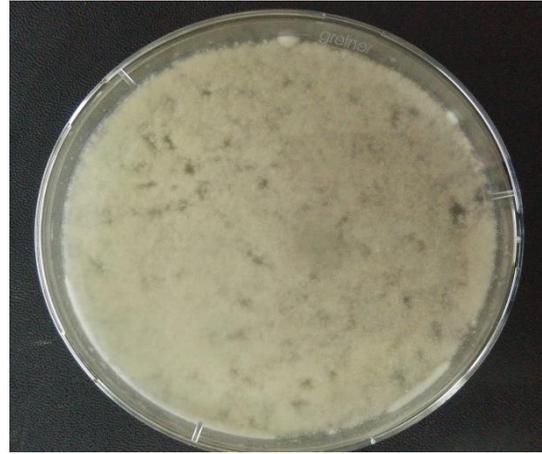


Figura 70. En la microfotografía puede observarse al *A. fumigatus* sobre una placa de agar recuento (Duplicado).

4.7.9.c- Ensayo del Neutralizante (Bicarbonato de sodio):

Para la realización de ésta prueba, fueron necesarios dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de monopersulfato de potasio a concentración 1/5. Se colocó en cada tubo 1 ml de Bicarbonato de sodio a doble concentración (2X); agitando en vórtex y manteniendo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente fueron agregados 100 µl de la suspensión fúngica número 5 homogenizando y manteniendo a 20° C durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, dos alícuotas de 100 ul de cada tubo (cada uno se hizo por duplicado) se sembraron en superficie con perlas estériles. La incubación de las placas fue en estufa de cultivo a 30° C por cinco días para luego efectuar el recuento.



Figura 71 . La fotografía muestra el desarrollo de 2 placas con agua destilada, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5. (Por duplicado)

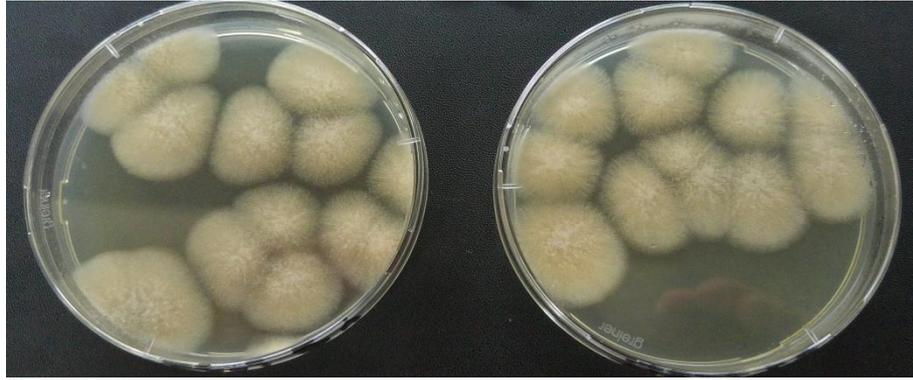


Figura 72. La fotografía indica el desarrollo de dos placas con Monopersulfato de potasio, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5. (Por duplicado)

4.7.9.d- Modificación del ensayo:

Como no pudo evaluarse la acción fungicida del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* en los tiempos estipulados (de acuerdo al protocolo de trabajo) fueron reiteradas las pruebas según los ítems 4.7.9.a, 4.7.9.b, 4.7.9.c. En este proceso se elevó el tiempo de contacto del desinfectante durante 1 hora y a las 10 horas.

4.7.9.e- Ensayo de la suspensión fúngica, del desinfectante (monopersulfato de potasio) y del neutralizante (bicarbonato de sodio). Tiempo de contacto del desinfectante: 1 hora.

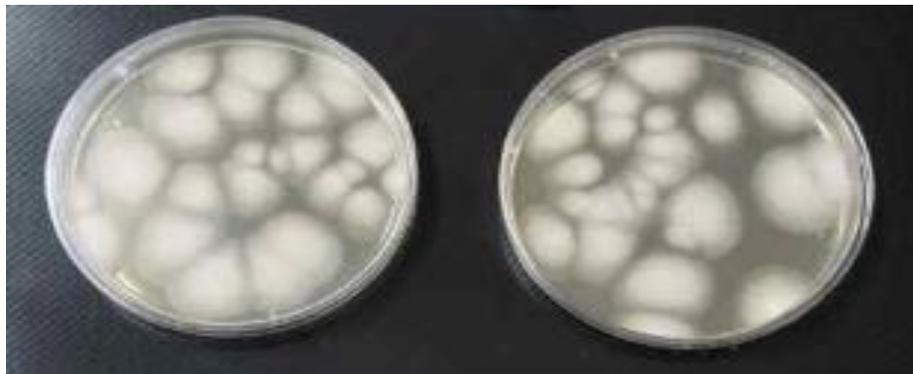


Figura 73. La imagen indica el desarrollo de *A. fumigatus* sobre una placa de agar recuento. (Por duplicado).



Figura 74. En la microfotografía puede observarse el gran desarrollo de *A. fumigatus* sobre dos placas con agar recuento (original y duplicado) luego de **1 hora** de acción del desinfectante.



Figura 75. La fotografía muestra el desarrollo de 2 placas (original y duplicado) con agua destilada, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5.



Figura 76. Desarrollo de dos placas con Monopersulfato de potasio, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5. (Por duplicado)

4.7.9.f- Ensayo de la suspensión fúngica, del desinfectante (monopersulfato de potasio) y del neutralizante (bicarbonato de sodio). Tiempo de contacto del desinfectante: 10 horas.

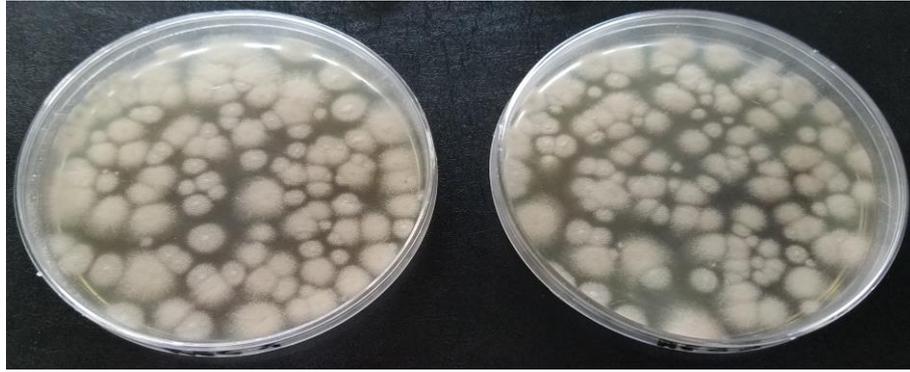


Figura 77. Desarrollo de *A. fumigatus* sobre dos placas de agar recuento (original y duplicado).



Figura 78. La microfotografía muestra 2 placas (original y duplicado) con agar recuento y *A. fumigatus* luego de **10 horas** de acción del desinfectante.



Figura 79. Desarrollo de 2 placas (original y duplicado) con agua destilada, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5.

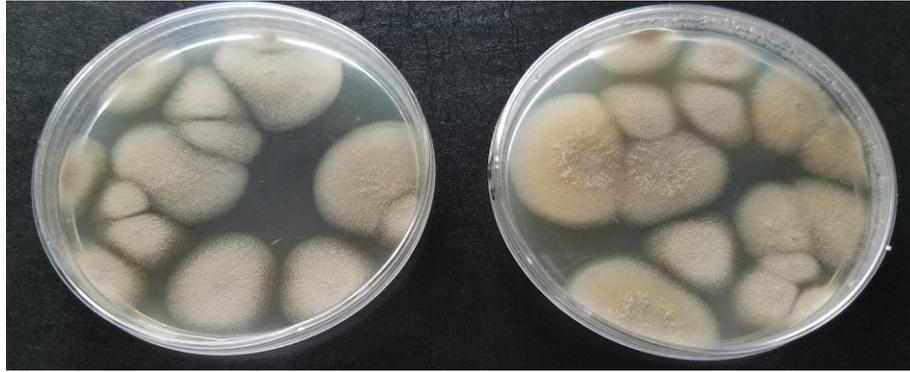


Figura 80. En la fotografía se observa el desarrollo de dos placas con Monopersulfato de potasio, bicarbonato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5. (Por duplicado)

4.7.10- Prueba de dilución/neutralización del Hipoclorito de sodio sobre *Aspergillus fumigatus*.

4.7.10.a- Ensayo de la suspensión fúngica:

Para cumplimentar éste ensayo fueron realizadas las diluciones de acuerdo al (ítem 4.3.3). Se tomaron 100 μ l de la suspensión fúngica del tubo N° 6 sembrándolas en la superficie de una placa de Petri con agar recuento, homogenizando con perlas estériles. Éste proceso fue repetido una vez más para obtener un duplicado. El método de siembra seleccionado se detalla en el ítem 4.7.9.a. Realizada esta operación se incubaron las placas a 30° C por cinco días para efectuar el recuento.

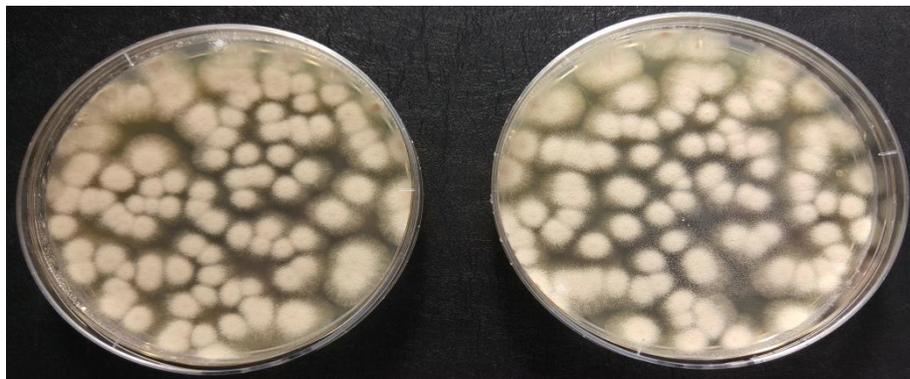


Figura 81. La imagen detalla el desarrollo del *A. fumigatus* sobre una placa de agar recuento y su respectivo duplicado

4.7.10.b- Ensayo del desinfectante (Hipoclorito de sodio):

Para evaluar el efecto fungicida del desinfectante se efectuó el siguiente procedimiento: extracción de 100 μ l del tubo que contenía la suspensión de ensayo ($1-3 \times 10^8$ conidios/ml); introducción en un tubo con 900 μ l de Hipoclorito de sodio; homogenizado en vórtex; reposo durante 5 minutos a 20 ° C; extracción de 250 μ l para añadirlos en un tubo con 2.25 ml de tiosulfato de sodio a concentración simple

(1X); agitación y mantenimiento durante 10 minutos a 20° C; extracción de 100 ul de la suspensión lograda; siembra en la superficie de una placa con agar recuento (por duplicado) con perlas estériles; inmediata incubación de las placas a 30° C por cinco días para efectuar el recuento.

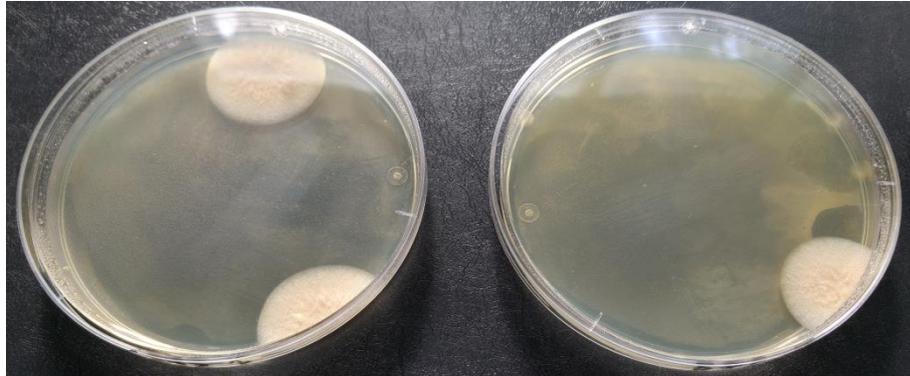


Figura 82. Las imágenes fotográficas muestran dos placas con suspensión de ensayo, hipoclorito de sodio y tiosulfato de sodio (1X) (por duplicado).

4.7.10.c- Ensayo del Neutralizante (Tiosulfato de sodio):

Para la operativización de este ensayo se emplearon dos tubos: uno con 1 ml de agua destilada estéril y otro con 1 ml de hipoclorito de sodio a concentración 1/5. En cada tubo fue agregado 1 ml de tiosulfato de sodio a doble concentración (2X), agitando en vórtex y manteniendo a 20° C durante 10 minutos. Inmediatamente se agregaron 100 µl de la suspensión fúngica número 5, homogenizando y manteniendo a 20° C durante 5 minutos. Transcurrido ese lapso, dos alícuotas de 100 ul de cada tubo (por duplicado) fueron sembradas en superficie, homogenizando con perlas estériles. Posteriormente se realizó la incubación de las placas en estufa a 30° C por cinco días para efectuar el recuento.



Figura 83 . La fotografía digital evidencia el desarrollo de dos placas con agua destilada, Tiosulfato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5. (original y duplicado)

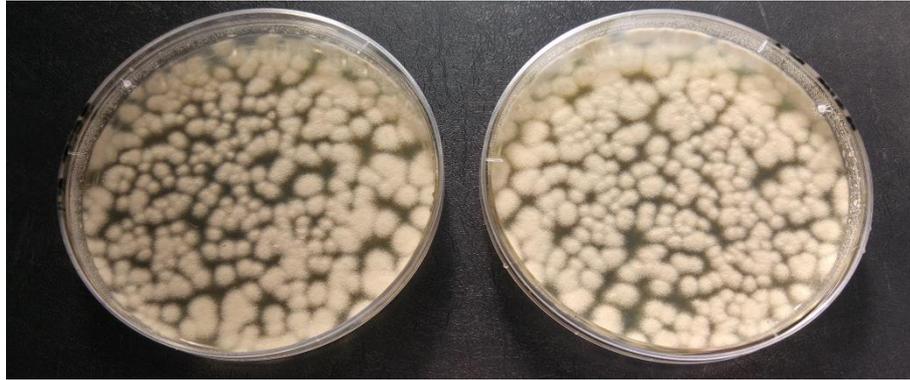


Figura 84. La fotografía digital muestra el desarrollo de dos placas con hipoclorito de sodio, tiosulfato de sodio 2X y suspensión fúngica del tubo 5.

4.8- Pruebas estadísticas:

Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el de test de varianza ANOVA y las pruebas de comparaciones múltiples de medidas repetidas, cuando las diferencias resultaron significativas.

Análisis de varianza ANOVA:

ANOVA puede ser considerado como una manera de verificar si dos o más medidas muestrales fueron extraídas de una misma población o de poblaciones con el mismo valor esperado para una magnitud dada. En consecuencia, cuando estas medias muestrales no resultan coincidentes habrá que suponer que provienen de poblaciones diferentes; por efecto causado por un factor en estudio.

ANOVA es un método general que se extiende a comparaciones múltiples, pudiendo demostrar que coincide con el de Student si se aplica a sólo dos muestras. Es decir, el modelo de Student es un caso particular del ANOVA. Este modelo desarrollado por R. A. Fisher a principios de este siglo tiene una distribución teórica esperada: la función F, tabulada por G. W. Snedecor. Los tests estadísticos a realizar se basan en comparar el valor muestral calculado con los datos medidos: F contra un valor crítico de tablas F_{α} . La idea básica del método es que las muestras sean *normales*, *independientes* y *aleatorias* estimando que todas tienen la misma varianza. Para que provengan de una misma población se necesita únicamente que las medias muestrales sean todas iguales. La hipótesis nula H_0 se usa en todos los modelos de ANOVA, junto con los cuatro supuestos mencionados.

Las comparaciones múltiples se basan en establecer cuál es la diferencia mínima de las medias aritméticas de los grupos que tienen una probabilidad (P) de producirse, inferior a un valor crítico (5 %, $P < 0,05$ o 1 %, $P < 0,01$) (Por Ejemplo) si la hipótesis nula es verdadera.

Cuando la diferencia observada entre los grupos de un estudio es mayor que esa mínima diferencia significativa de igualdad de media aritmética entre las poblaciones la hipótesis es rechazada y se dirá que la diferencia es significativa.

El modelo de ANOVA estudia una sola fuente de variación como factor de análisis, el cual se subdivide en subgrupos de tipo jerárquico para su estudio como fuentes de variación separadas. Es decir fuentes o factores dentro de una clasificación superior. El cálculo del modelo de ANOVA de dos factores se puede clasificar en dos:

- a) *sin repetición*, cuando hay un solo dato por cada combinación posible de los factores.
- b) *con repetición*, cuando hay más de un dato para cada caso o combinación de factores posibles (Macchi, 2001; Azzimonti Renzo, 2003).

5- Resultados:

5.1- Estudio de la acción microbicida de los desinfectantes (NaClO y KHSO5):

Con base en lo mencionado en los capítulos anteriores fue analizado el efecto microbicida del hipoclorito de sodio (NaClO) y del monopersulfato de potasio (KHSO5) sobre los microorganismos más frecuentes presentes en ambientes odontológicos. Aquellos representan cuatro cepas bacterianas y una fúngica de tipo sénil.

5.1.1- Análisis estadístico de los resultados obtenidos. Significancia.

Las variables consideradas en este estudio fueron:

- **La suspensión bacteriana y/o fúngica,**
- **El desinfectante**
- **El neutralizante.**

5.2- Resultados del recuento de UFC (Unidades formadoras de colonia) en placas en relación al hipoclorito de sodio.

5.2.1- Análisis de las suspensiones bacterianas con Hipoclorito de sodio:

Realizado el procedimiento indicado en el ítem 4.4 (extracción del tubo 6 de 1 ml de la suspensión bacteriana y colocación en una placa de Petri por duplicado; incorporación de agar recuento; inversión de las placas e incubación a 37° C de 18-24 horas según la cepa), se llevó a cabo el recuento de colonias sobre la superficie de cada placa denominándolas “placa 1” a la original y “placa 2” al duplicado. Se obtuvieron los valores medios de cada recuento y se los denominó (R).

En las figuras 85, 86, 87 y 88, se observa el desarrollo de las UFC en placa de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

5.2.1.a- Recuento de las UFC en placas con *E. coli*.

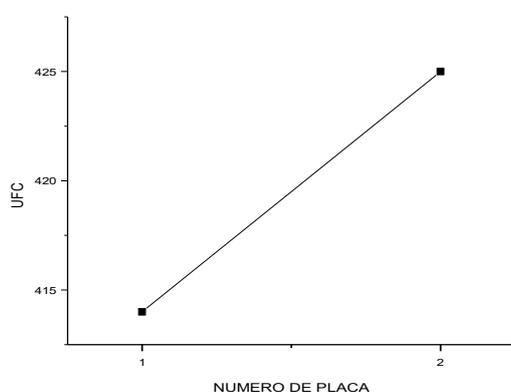


Fig. 85. Moderado incremento de las UFC entre las placas 1 y 2.

5.2.1.b- Recuento de las UFC en placas con *S. aureus*.

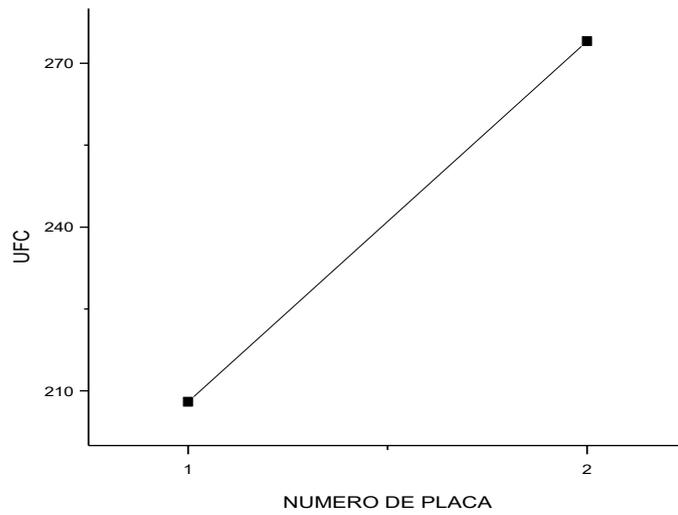


Fig. 86. Ascenso de la curva entre las placas 1 y 2.

5.2.1.c- Recuento de las UFC en placas con *P. aeruginosa*.

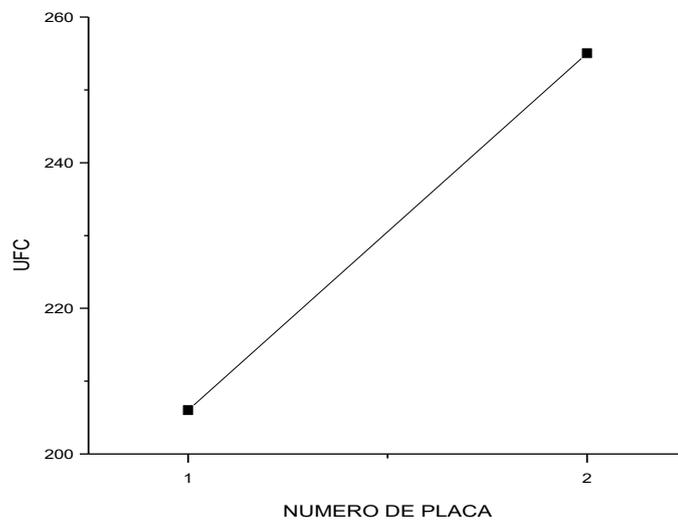


Fig. 87. Marcado desarrollo de las UFC en la placa 2 en relación a la placa 1.

5.2.1.d- Recuento de las UFC en placas con *A. baumannii*.

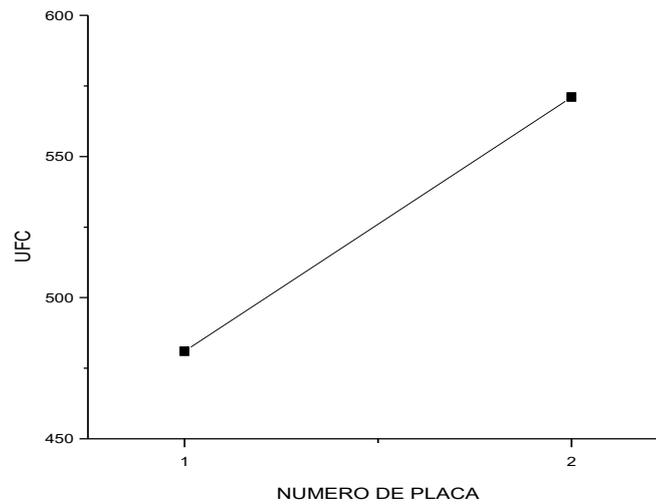


Fig. 88 .Incremento de las UFC en la placa 2 en comparación con las UFC de la placa 1.

5.2.1.e- Recuento comparativo del valor medio de las UFC de las diferentes bacterias:

Los valores medios (R) obtenidos del análisis estadístico comparativo de las UFC presentes en los cultivos, en orden creciente fueron: *P. aeruginosa* (R:230.5 UFC), *S. aureus* (R:241 UFC), *E. coli* (R: 419 UFC) y *A. baumannii* (R: 526 UFC). Tal como lo indica la figura 89, el mayor desarrollo de UFC, se observó en la placa con *A. baumannii*, mientras que el menor valor se registró en la placa con *P. aeruginosa*. El análisis estadístico de las UFC arrojó un número significativo siendo $P \leq 0.05$.

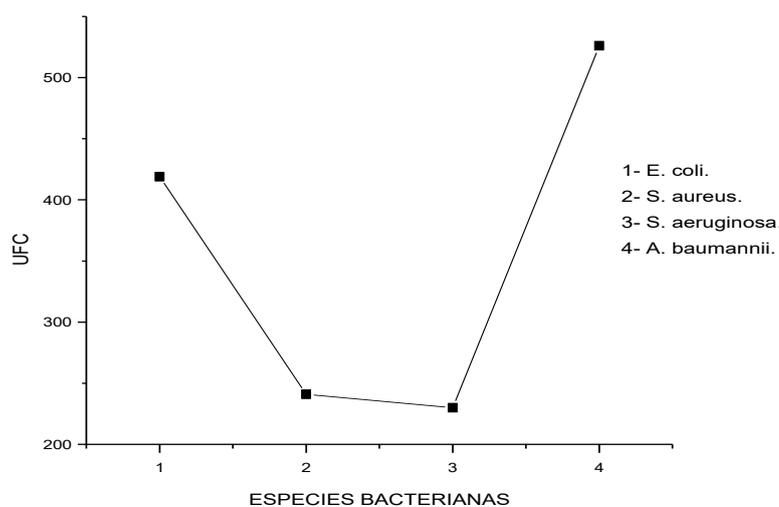


Fig. 89. Leve aumento de los valores medios entre las placas 2 y 3, marcado incremento en la placa 1 e importante ascenso en la placa 4.

5.2.2- Resultados del efecto bactericida del hipoclorito de sodio.

Luego de efectivizadas la incubación de acuerdo a cada microorganismo, se procedió al recuento de colonias de cada placa (original=Placa A1 y duplicado= Placa A2); obteniendo el valor medio al que se denominó (**D**).

Para que una concentración de desinfectante sea microbicida se tiene que producir una reducción de 10^5 en el número de microorganismos [$D \leq (C/10)$].

Para el cálculo de la reducción logarítmica se consideraron los datos obtenidos en el recuento de la suspensión microbiana realizado durante las diluciones hasta un total de 10^{-6} . El valor inicial de la suspensión es $C \times 10^6$, en ésta última se realizaron dos diluciones, la primera de 1/10 para el desinfectante y la segunda de 1/10 para el neutralizante siendo $C \times 10^4$.

En relación a lo descrito anteriormente, la reducción logarítmica se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\log. (C \times 10^4) - \log D$$

Como muestran las figuras 90,91 ,92 y 93, el valor del efecto bactericida del hipoclorito de sodio arrojó el mismo resultado (cero) para las cuatro cepas bacterianas.

5.2.2.a- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *E. coli*.

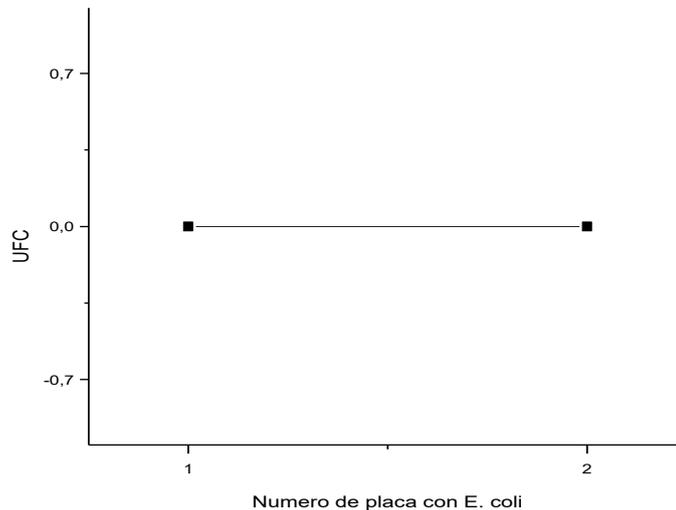


Fig. 90. No se observan diferencias en el desarrollo de UFC de ambas placas.

5.2.2.b- Efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *S. aureus*.

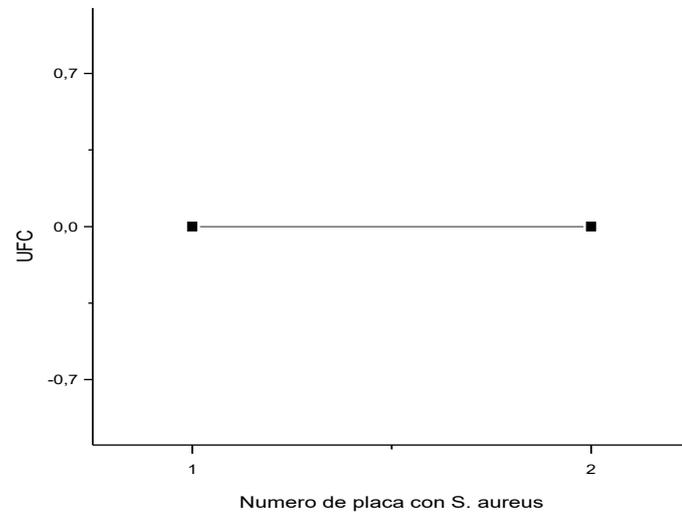


Fig. 91. No se evidencian diferencias en el desarrollo de UFC entre la placa 1 la placa 2.

5.2.2.c- Efecto del hipoclorito de sodio sobre *P.aeruginosa*.

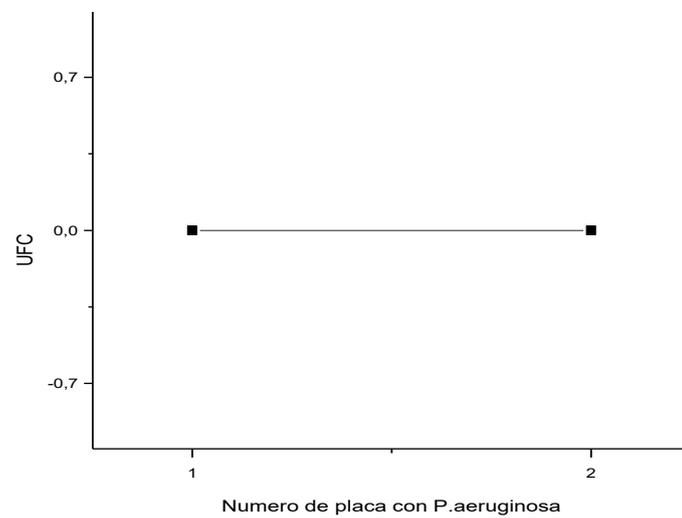


Fig. 92. Sin desarrollo de *P. aeruginosa* sobre ambas placas de Petri.

5.2.2.d- Efecto del hipoclorito de sodio sobre *A. baumannii*.

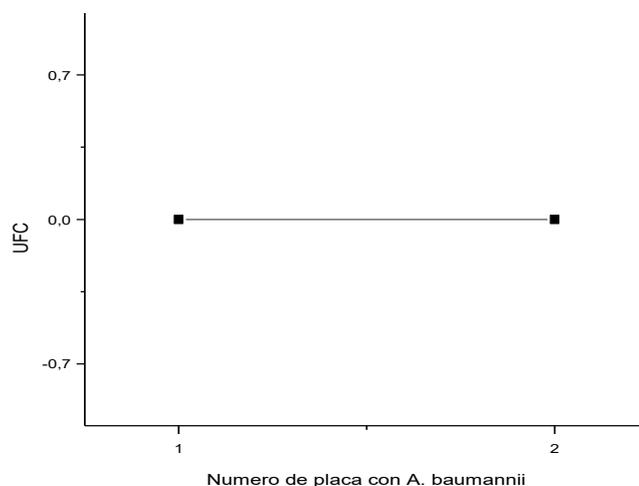


Fig. 93. La placa 1 y la placa 2 no presentan desarrollo.

5.2.2.e- Análisis comparativo del efecto bactericida del hipoclorito de sodio.

En todos los casos, la media “D” fue igual a cero (0). Aplicando el test de varianza no se halló un resultado estadístico significativo, siendo $P > 0.05$.

Comparación de los valores medios (D) del efecto desinfectante del hipoclorito de sodio sobre las bacterias seleccionadas.

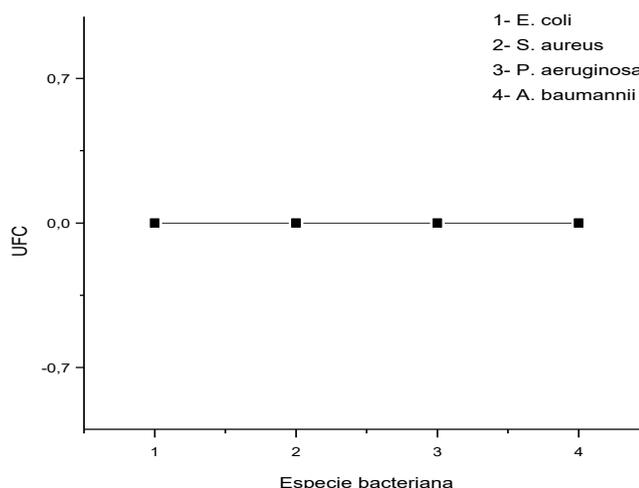


Fig. 94. Ausencia de desarrollo de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

❖ **En base a las pruebas estadísticas realizadas y a las normas AFNOR, los resultados obtenidos indican que el hipoclorito de sodio fue efectivo**

sobre todas las bacterias sin variación significativa sobre las distintas cepas.

5.2.3- Resultados del neutralizante sobre el hipoclorito de sodio.

Cumplimentado el tiempo de incubación se procedió a evaluar el efecto del neutralizante para el hipoclorito de sodio, realizando el recuento de colonias. El valor medio de las dos placas con agua destilada (original= Placa A1 y duplicado= Placa A2) se denominó (C) y el valor medio de las dos placas con desinfectante (original= Placa B1 y duplicado= Placa B2), fue denominado (N).

Para que el neutralizante se considere efectivo debe proteger al 50% de los microorganismos presentes, es decir: $N \geq 0.5 C$.

Las figuras (95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 y 105) detallan el efecto del neutralizante (tiosulfato de sodio) sobre:

- Tubo A (1ml de agua destilada, neutralizante en concentración doble, y la suspensión bacteriana del tubo 5).
- Tubo B (1ml de hipoclorito de sodio, neutralizante en concentración doble, y la suspensión bacteriana del tubo 5)
- y la comparación de los valores medios entre ambos, teniendo en cuenta que el posterior cultivo fue realizado en placa de Petri.

5.2.3.a- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo "A" y a una dilución bacteriana de *E. coli*.

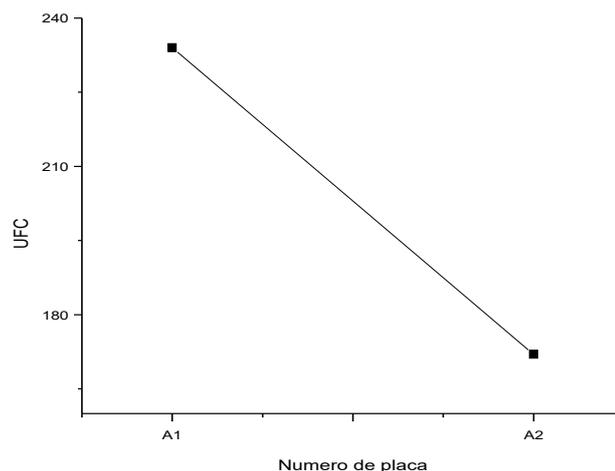


Fig. 95. Marcado incremento del desarrollo de UFC en la placa A1 en relación a la placa A2.

5.2.3.b- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *E. coli*.

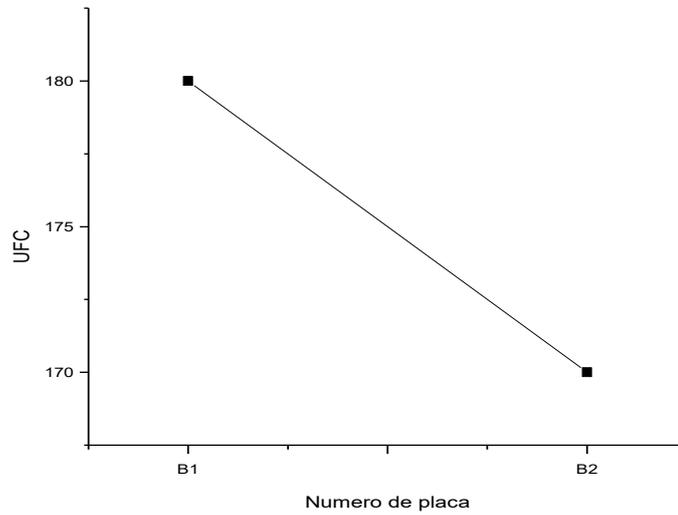


Fig. 96. Moderado descenso de las UFC en la placa B2 con respecto a la placa B1.

5.2.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *E. coli*.

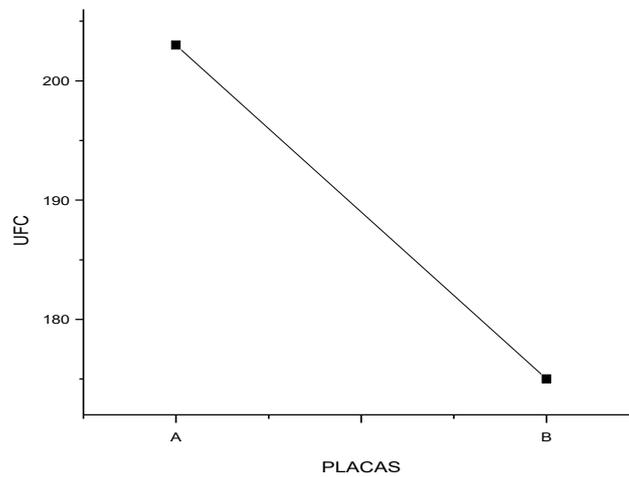


Fig. 97. Marcado ascenso de las UFC en las placas A en relación a las placas B.

5.2.3.d- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

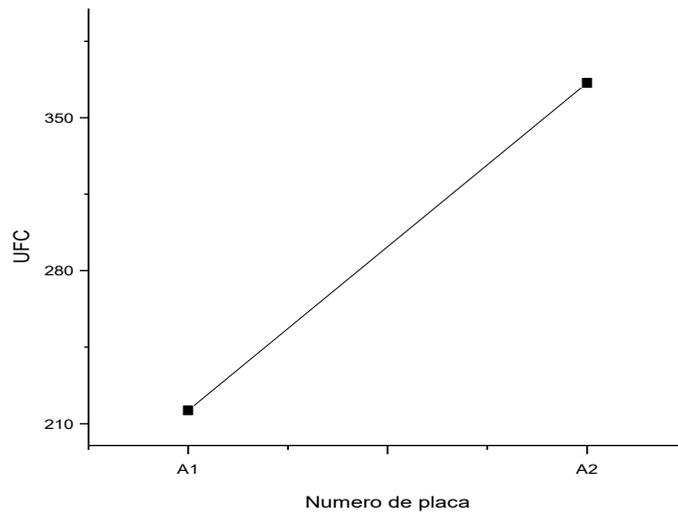


Fig. 98. Ascenso de las UFC en la placa A2 en relación a la placa A1.

5.2.3.e- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

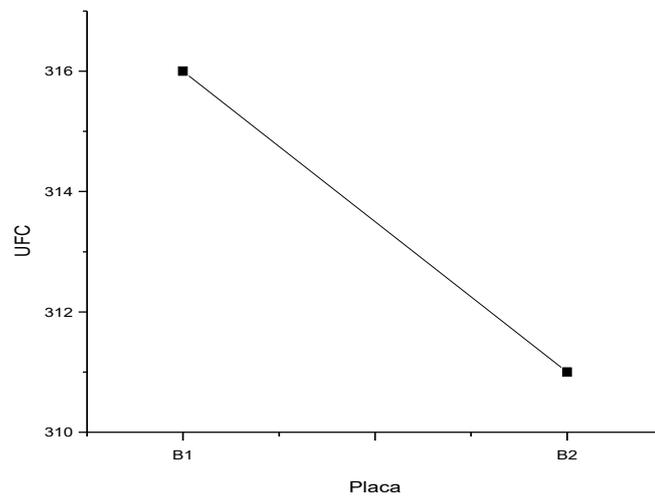


Fig. 99. Línea descendente de las UFC de la placa B1 a la placa B2.

5.2.3.f- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

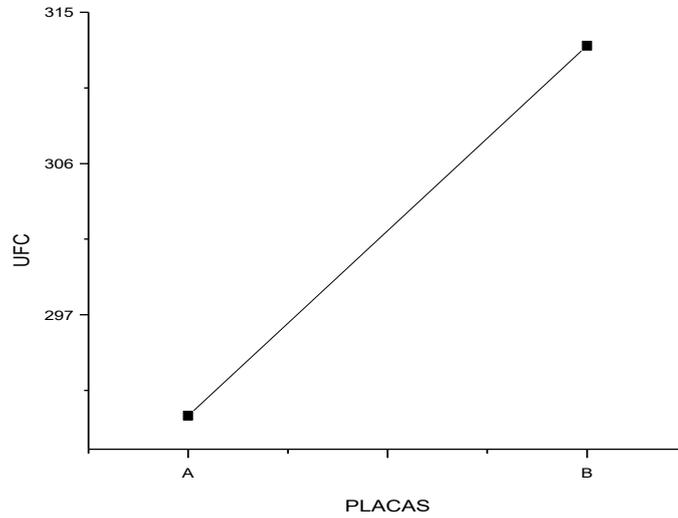


Fig. 100. Moderado descenso de las UFC en las placas A en relación a las placas B.

5.2.3.g- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

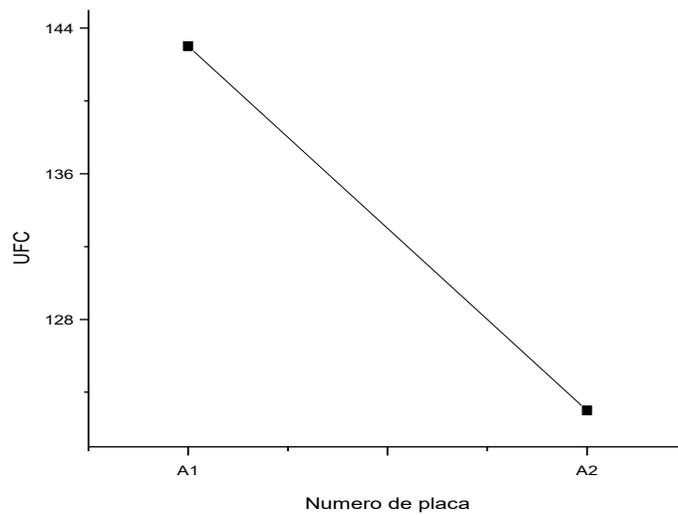


Fig.101. Aumento del número de UFC en la placa A1 en relación a la placa A2.

5.2.3.h- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

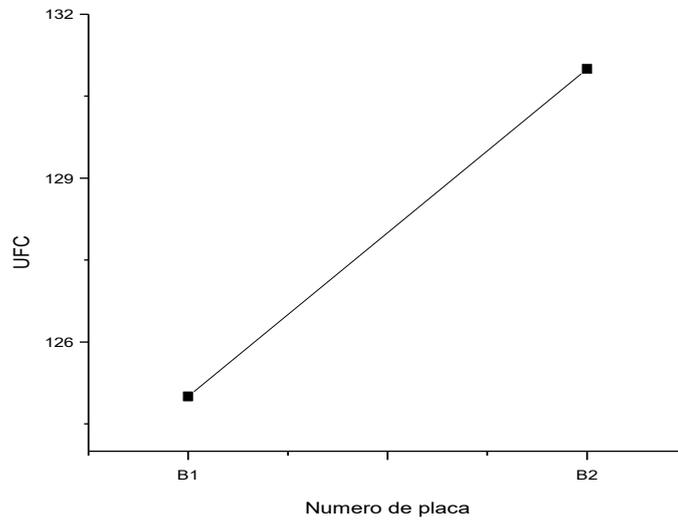


Fig.102. Escasa diferencia en el número de UFC de la placa B1 con respecto a la placa B2.

5.2.3.i- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

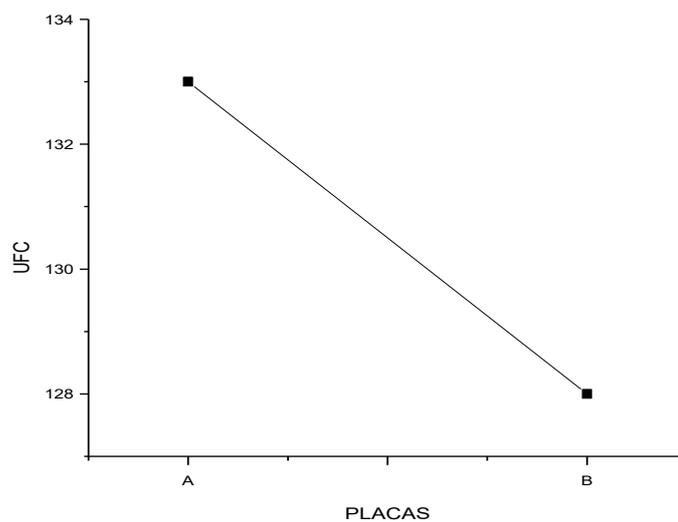


Fig.103. Leve descenso de las UFC en las placas B en relación a las placas A.

5.2.3.j- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

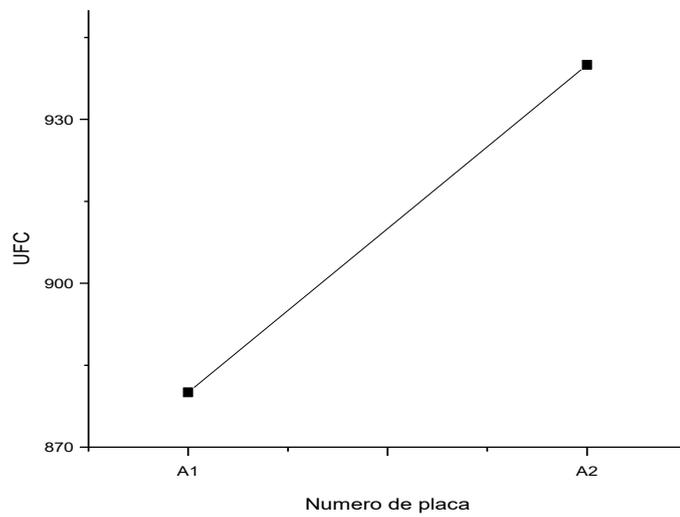


Fig.104. Moderado ascenso de las UFC en la placa A2 en relación a la placa A1.

5.2.3.k- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

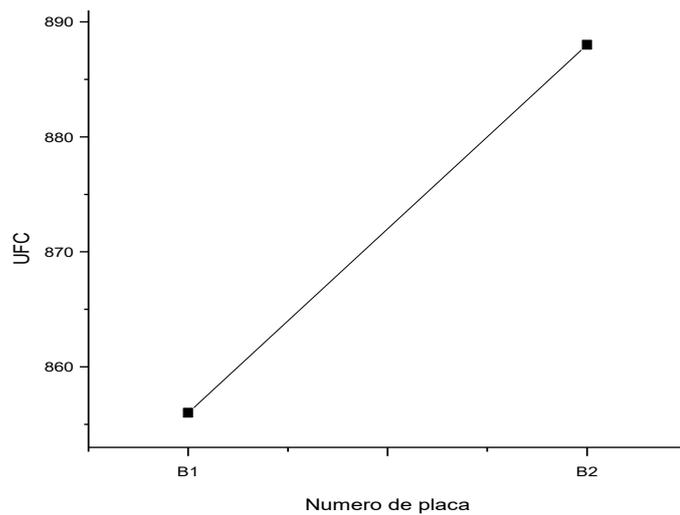


Fig.105. Disminución de las UFC en la placa B1 en relación a la placa B2.

5.2.3.1- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

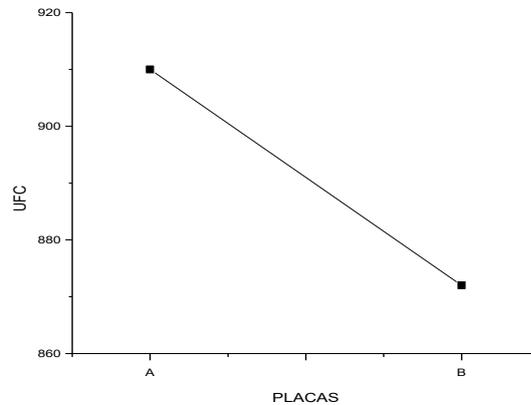


Fig.106. Leve descenso de las UFC en las placas B en relación a las placas A.

❖ **Los resultados obtenidos demuestran que el hipoclorito de sodio interrumpe su acción al ser aplicado el neutralizante (tiosulfato de sodio).**

5.3- Resultados del recuento de UFC en placas en relación al Monopersulfato de potasio.

Transcurrido el tiempo de incubación de cada microorganismo, se realizó el recuento de colonias sobre la superficie de cada placa (original= Placa 1 y duplicado= Placa 2). Los resultados se indican en las figuras 107, 108, 109 y 110. A los valores medios obtenidos se los denominó (R) fig. 111.

5.3.1- Análisis de las suspensiones bacterianas con monopersulfato de potasio:

5.3.1.a- Recuento de las UFC en placas con *E. coli*.

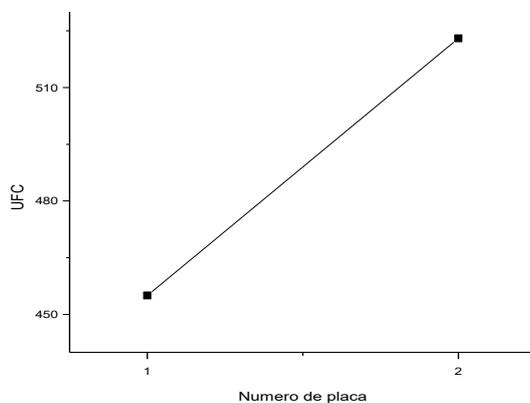


Fig.107. Moderado incremento en relación al desarrollo de las UFC de la placa 1.

5.3.1.b- Recuento de las UFC en placas con *S. aureus*

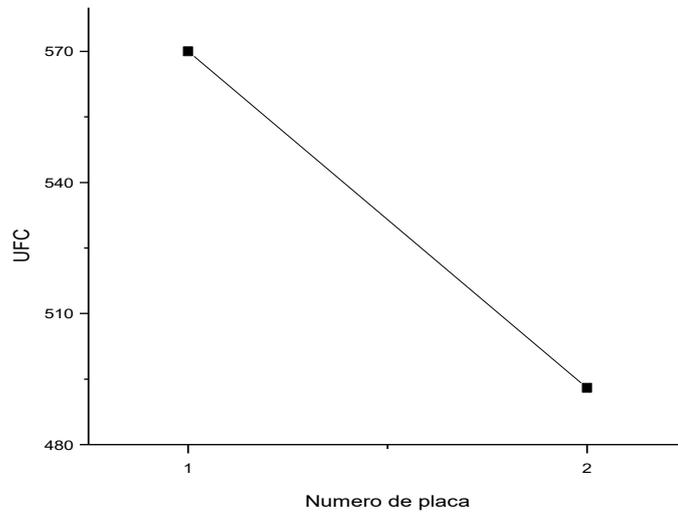


Fig.108. Descenso de la curva entre las placas 1 y 2.

5.3.1.c- Recuento de las UFC en placas con *P. aeruginosa*.

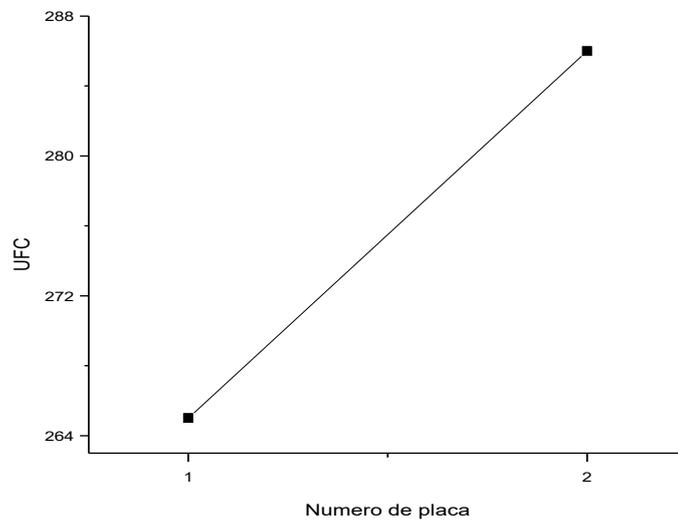


Fig.109. Leve incremento de las UFC en la placa 2 con respecto a la placa 1.

5.3.1.d- Recuento de las UFC en placas con *A. baumannii*.

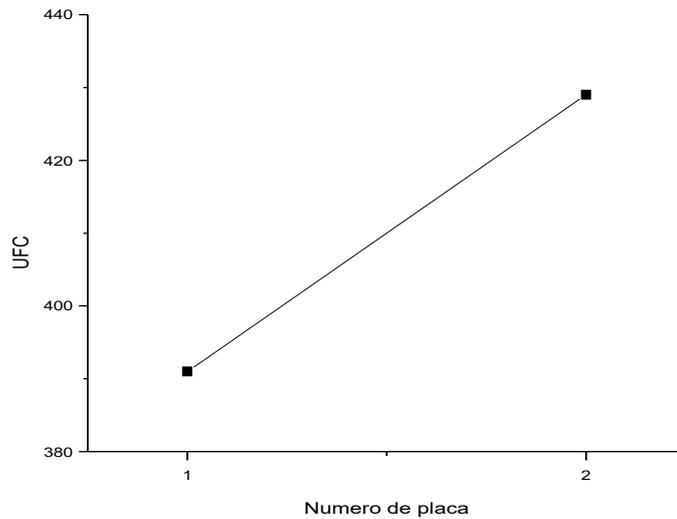


Fig.110. Incremento de las UFC en la placa 2 en comparación con las UFC de la placa 1.

5.3.1.e- Recuento comparativo del valor medio de las UFC de las diferentes bacterias:

Los valores medios (R) obtenidos del análisis estadístico comparativo de las UFC presentes en los cultivos en orden creciente fueron: *S. aeruginosa* (R:275 UFC), *A. baumannii* (R: 410 UFC), *E. coli* (R: 439 UFC), *S. aureus* (R:531 UFC). El mayor desarrollo de UFC (Fig. 111) se observa en la placa con *S. aureus*, mientras que el menor valor se registra en la placa con *P. aeruginosa*.

El análisis estadístico mediante el test de varianza, arrojó una diferencia significativa sólo en los valores medios de las UFC de las placas 2 y 3, siendo $P < 0,02$.

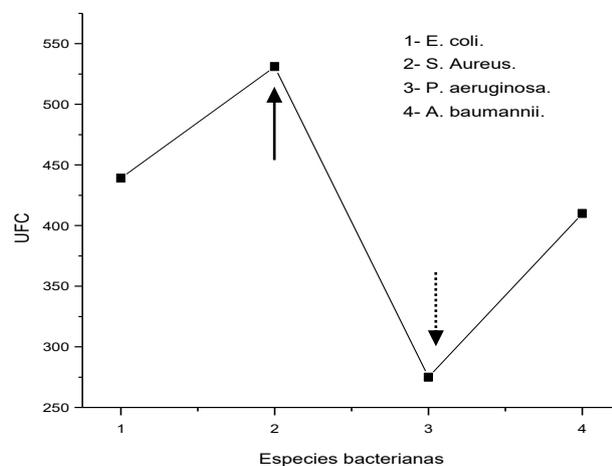


Fig.111. La flecha negra continua, muestra el máximo desarrollo de UFC (placa 2); la flecha negra discontinua señala el mínimo desarrollo de UFC (placa 3).

5.3.2- Resultado del efecto bactericida del monopersulfato de potasio.

Realizada la incubación de acuerdo a cada microorganismo, se hizo el recuento de colonias de cada placa (original=Placa A1 y duplicado= Placa A2), obteniendo el valor medio al que se denominó **(D)**.

Para que una concentración de desinfectante sea microbicida se tuvo que producir una reducción de 10^5 en el número de microorganismos, es decir: **$D \leq (C/10)$** .

Para el cálculo de la reducción logarítmica fue necesario tener en cuenta los datos obtenidos en el recuento de la suspensión microbiana realizado durante las diluciones hasta un total de 10^{-6} , en ésta última se realizaron dos diluciones, la primera de 1/10 para el desinfectante y la segunda de 1/10 para el neutralizante siendo **$C \times 10^4$** .

En relación a lo descrito anteriormente, la reducción logarítmica se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\log. (C \times 10^4) - \log D$$

En las figuras 112, 113 y 114, el valor del efecto bactericida del monopersulfato de potasio tuvo el mismo resultado (cero) en las tres cepas (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*), mientras que en la restante (*A. baumannii*) se registraron valores diferentes (fig. 115).

5.3.2.a- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *E. coli*.

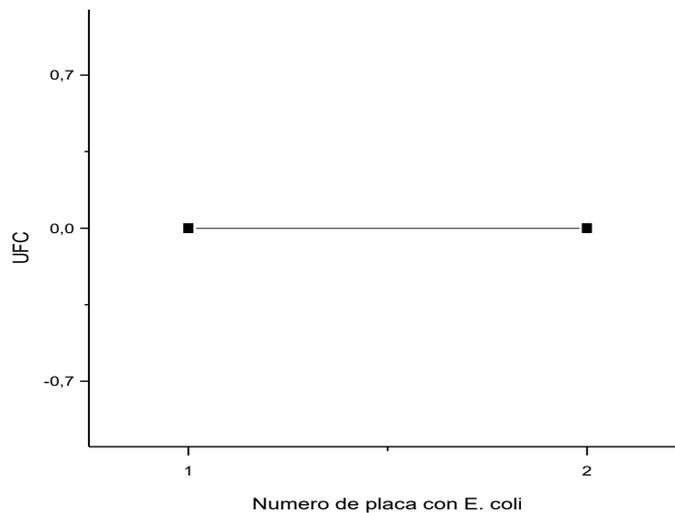


Fig. 112. Ausencia de desarrollo de las UFC de *E. coli* sobre la superficie de la placa de Petri.

5.3.2.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *S. aureus*.

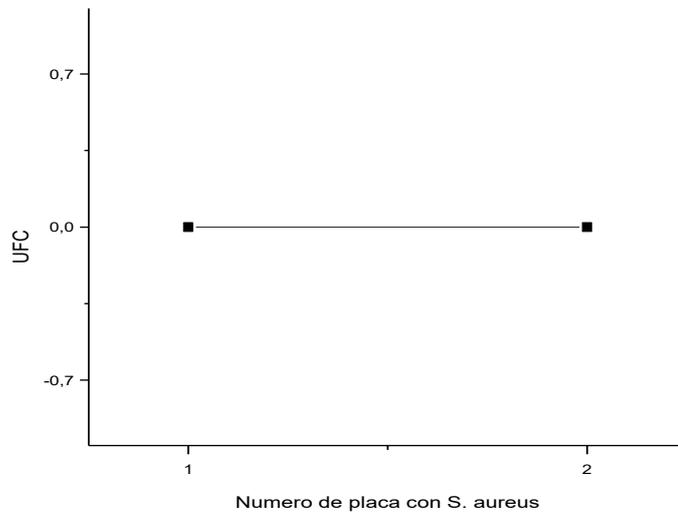


Fig.113. Entre la placa 1 y la placa 2 no se advierten diferencias.

5.3.2.c- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *P.aeruginosa*.

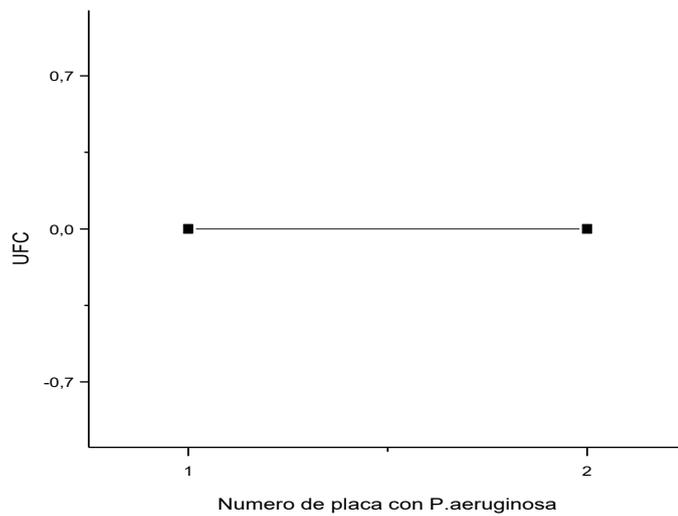


Fig.114. No se observan diferencias entre las 2 placas.

5.3.2.d- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *A. baumannii*.

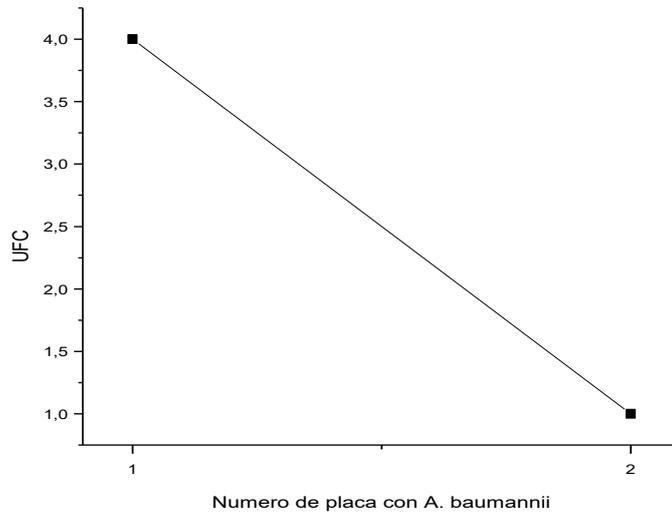


Fig. 115. Aumento de las UFC de *A. baumannii* en la placa 1 en comparación con la placa 2.

5.3.2.e- Análisis comparativo del efecto bactericida del monopersulfato de potasio.

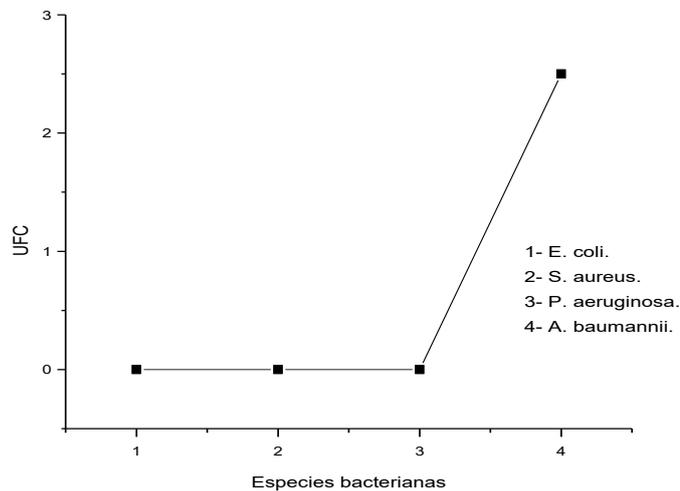


Fig.116. *E. coli*, el *S. aureus* y la *P. aeruginosa* presentaron una media D: (0), mientras que en el *A. baumannii* la media D: (2.5). Se obtuvo un resultado estadísticamente significativo, siendo: $P < 0.01$.

❖ **De acuerdo a los datos estadísticos obtenidos y a las normas AFNOR, el monopersulfato de potasio demostró efecto bactericida.**

5.3.3- Resultados del neutralizante sobre el monopersulfato de potasio.

Cumplimentado el tiempo de incubación se procedió al recuento de colonias, obteniendo el valor medio de las dos placas con agua destilada (original= Placa A1 y duplicado= Placa A2) al que se denominó (C) y el valor medio de las dos placas con desinfectante (original= Placa B1 y duplicado= Placa B2), denominado (N).

Para comprobar la correcta acción del neutralizante, al menos el 50% de los microorganismos deben estar protegidos, o sea: $N \geq 0.5 C$.

Seguidamente, se muestran las figuras 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127 y 128 que detallan el efecto del neutralizante (bicarbonato de sodio) sobre:

- El tubo A (1ml de agua destilada, neutralizante en concentración doble, y la suspensión bacteriana del tubo 5).
- El tubo B (1ml de monopersulfato de potasio, neutralizante en concentración doble, y la suspensión bacteriana del tubo 5).
- y la comparación de los valores medios entre ambos, teniendo en cuenta que el posterior cultivo fue realizado en placa de Petri.

5.3.3.a- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo "A" y a una dilución bacteriana de *E. coli*

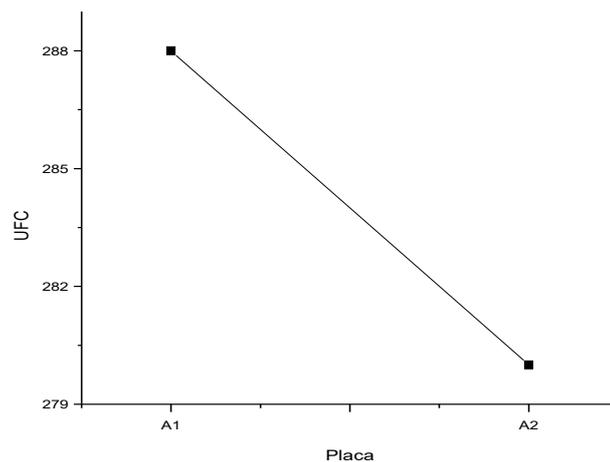


Fig.117. Leve incremento de las UFC de la placa A1 en relación a la placa A2.

5.3.3.b- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *E. coli*.

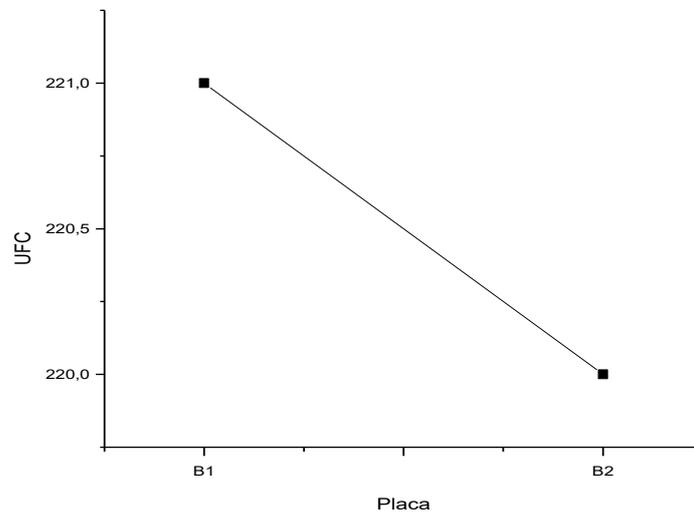


Fig.118. Leve incremento de las UFC de la placa B1 en comparación con la placa B2.

5.3.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *E. coli*.

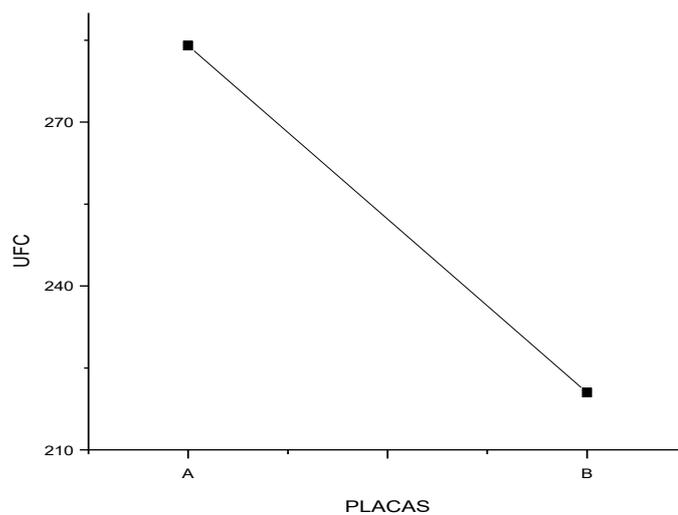


Fig.119. Importante incremento de las UFC de las placas A en relación a las placas B.

5.3.3.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

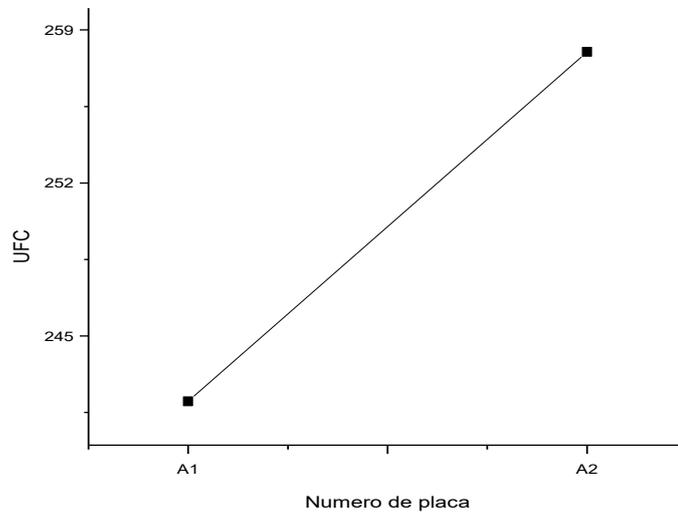


Fig.120. Leve incremento de las UFC en la placa A2 en relación al efecto del neutralizante.

5.3.3.e- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

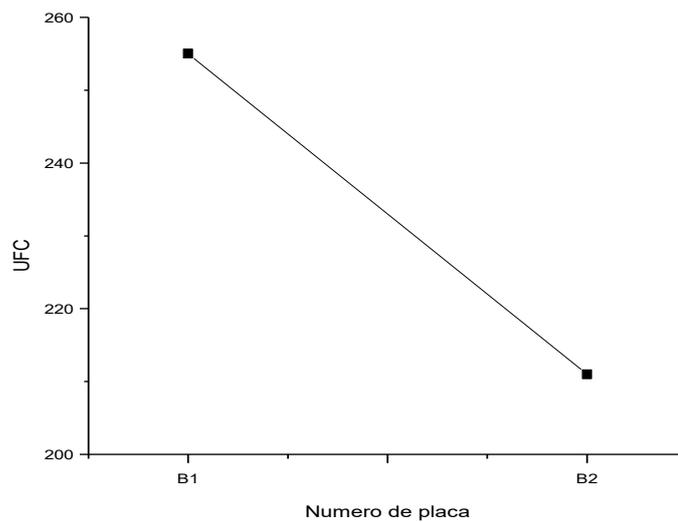


Fig.121. Mayor desarrollo de UFC en la placa B1. La curva desciende bruscamente en la segunda placa.

5.3.3.f- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *S. aureus*.

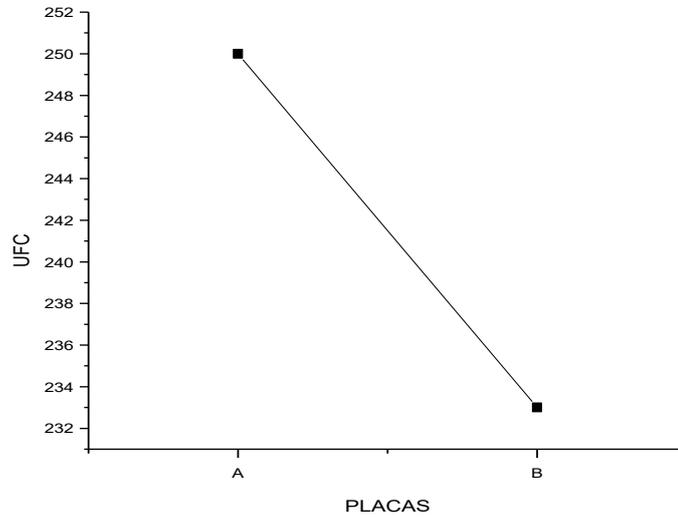


Fig.122. Leve crecimiento de las UFC en las placas A en comparación con las placas B.

5.3.3.g- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

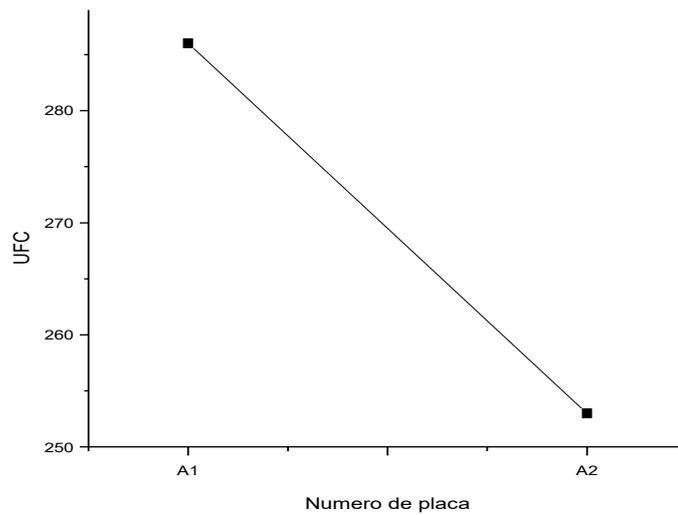


Fig.123. Moderado desarrollo de la placa 1 sobre la placa 2.

5.3.3.h- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

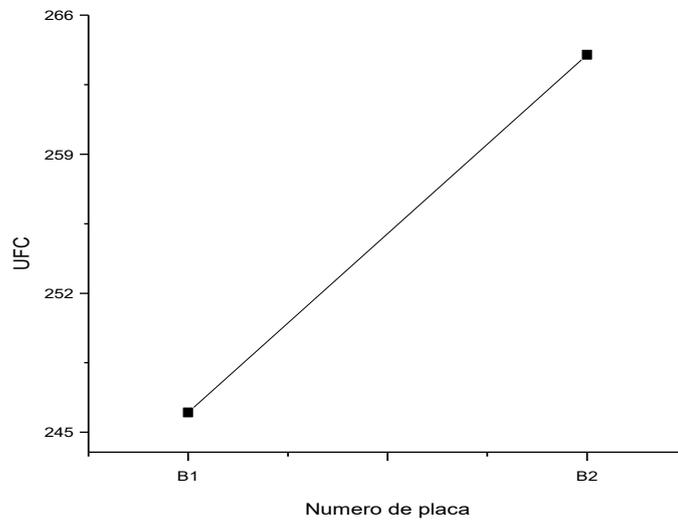


Fig. 124. Aumento en el desarrollo de las UFC de la placa 2 en comparación con la placa 1.

5.3.3.i- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *P. aeruginosa*.

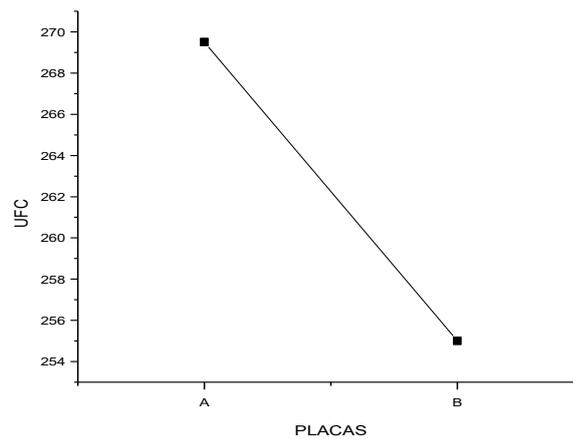


Fig. 125. Disminución de las UFC en las placas B en comparación con las placas A.

5.3.3.j- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

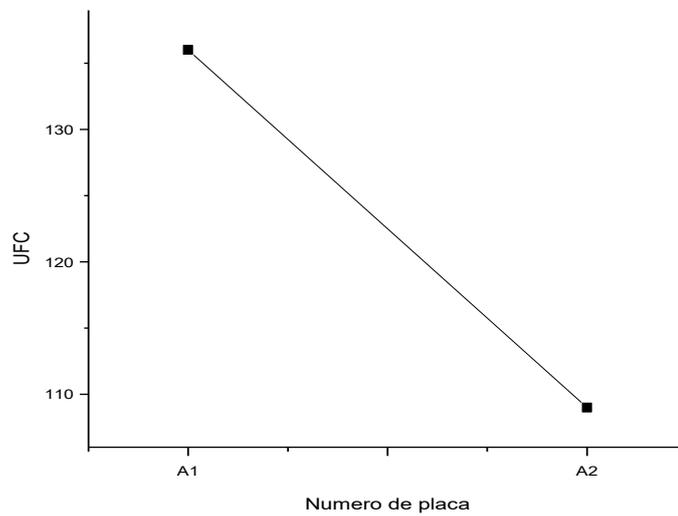


Fig. 126. La placa A1 revela un incremento de las UFC en relación a la placa A2.

5.3.3.k- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

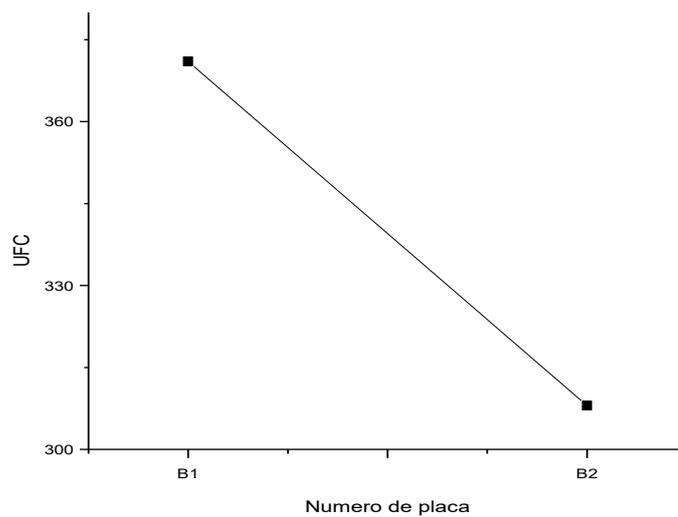


Fig. 127. Aumento de las UFC de *A. baumannii* en la placa B1, y menor desarrollo en la placa B2.

5.3.3.1- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio en relación a los tubos “A” y “B” y a una dilución bacteriana de *A. baumannii*.

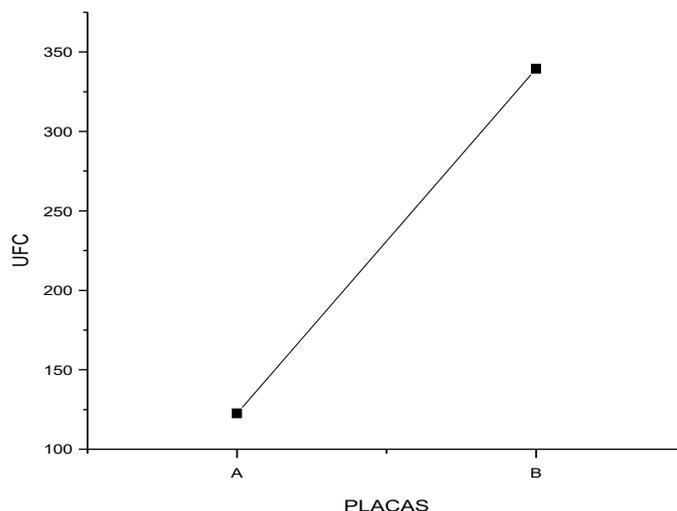


Fig. 128. Menor desarrollo de los valores medios de las UFC en las placas A.

- ❖ **Los resultados obtenidos demostraron que el monopersulfato de potasio interrumpió su acción al ser aplicado el neutralizante (bicarbonato de sodio).**

5.4- Acción fungicida de los desinfectantes.

En base a los procedimientos operativizados en ítems anteriores, se realizó el análisis estadístico de los resultados teniendo en cuenta las siguientes variables: **la suspensión fúngica, el desinfectante y el neutralizante.**

5.4.1- Resultados del recuento de UFC de *A. fumigatus* en relación al hipoclorito de sodio.

Concluida la incubación de *A. fumigatus*, se efectuó el recuento sobre la superficie de cada placa (original= Placa 1 y duplicado= Placa 2), que se indican en la Fig.129. Se obtuvieron los valores medios de cada recuento denominándolos (R)

5.4.1.a- Recuento de las UFC en placas con *A. fumigatus*.

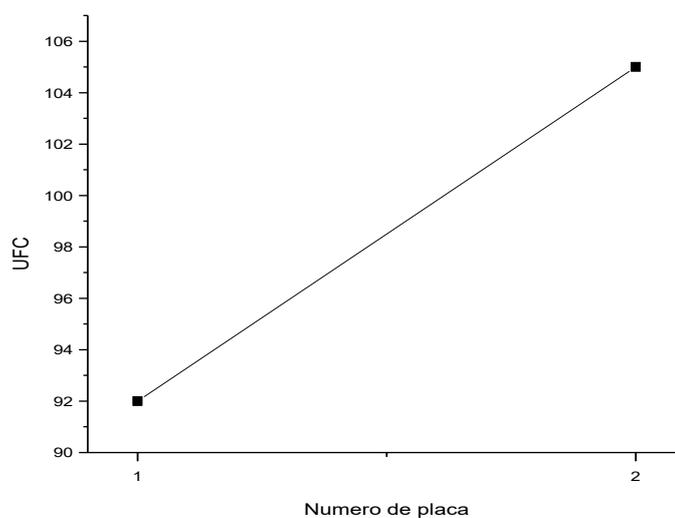


Fig. 129. Aumento en el desarrollo de las UFC de la placa 2 (duplicado) en relación a la placa 1 (original).

5.4.2- Resultado del efecto fungicida del hipoclorito de sodio.

Concluida la incubación del *A. fumigatus* se realizó el recuento de colonias de cada placa (original=Placa A1 y duplicado= Placa A2), obteniendo el valor medio al que se denominó (**D**).

Para considerar que una concentración de desinfectante sea fungicida, se tuvo que producir una reducción de 10^5 en el número de microorganismos; es decir: **D** \leq (**C/10**).

Para el cálculo de la reducción logarítmica se tuvieron en cuenta los datos obtenidos en el recuento de la suspensión fúngica efectuada durante las diluciones hasta un total de 10^{-6} . Por ende el valor inicial de la suspensión es **C x 10⁶**, que pasó por dos

diluciones: la primera de 1/10 para el desinfectante y la segunda de 1/10 para el neutralizante, siendo **C x 10⁴**. La reducción logarítmica se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\log. (C \times 10^4) - \log D$$

5.4.2.a- Efecto del hipoclorito de sodio sobre el *A. fumigatus*.

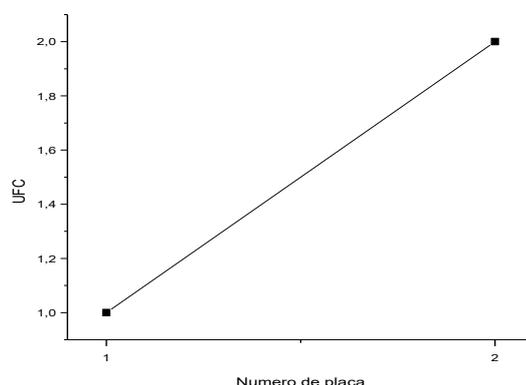


Fig. 130. Acción del (NaClO) sobre las placas 1 y 2 con *A. fumigatus*.
Se observa que la placa 2 presenta más desarrollo de las UFC que la placa 1.

❖ **De acuerdo a las normas AFNOR, el hipoclorito de sodio presentó acción fungicida.**

5.4.3- Resultados del neutralizante sobre el hipoclorito de sodio.

Terminado el tiempo de incubación se procedió al recuento de colonias, obteniendo el valor medio de las dos placas con agua destilada (original= Placa A1 y duplicado= Placa A2) al que se llamó (C) y el valor medio de las dos placas con desinfectante (original= Placa B1 y duplicado= Placa B2), denominado (N).

Para comprobar que el neutralizante fuese efectivo, al menos el 50% de los hongos deben estar protegidos, es decir $N \geq 0.5 C$.

5.4.3.a- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo "A" y a una dilución de *A. fumigatus*.

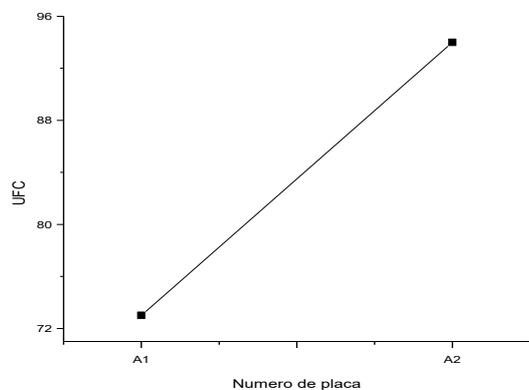


Fig. 131. Incremento de las UFC de la placa 2 en relación a la placa 1.

5.4.3.b- Efecto del neutralizante del hipoclorito de sodio en relación al tubo “B” y a una dilución de *A. fumigatus*.

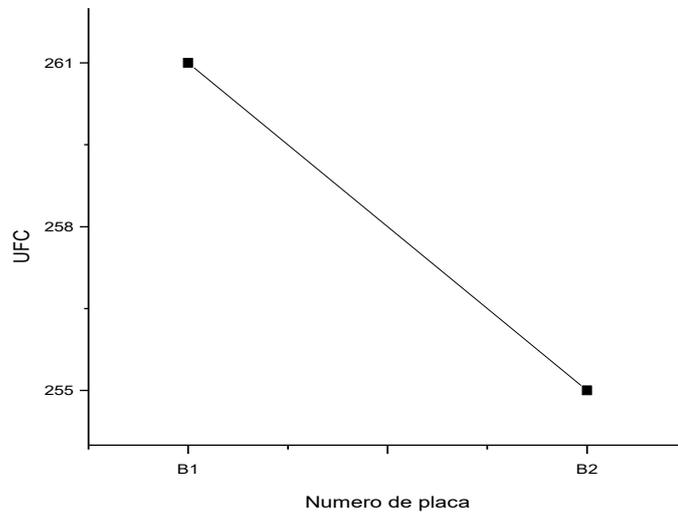


Fig. 132. Incremento de las UFC de la placa 1 en comparación con la placa 2.

5.4.3.c- Comparación del valor medio del neutralizante para hipoclorito de sodio (tiosulfato de sodio) en relación a los tubos A y B y una dilución de *A. fumigatus*.

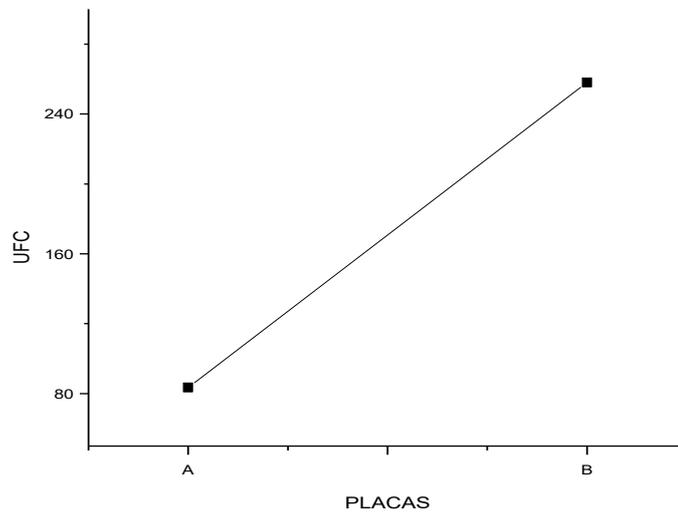


Fig. 133. Marcado incremento de las UFC de la placa B en comparación con la placa A.

- ❖ **Los resultados obtenidos demostraron que el hipoclorito de sodio interrumpió su acción al ser aplicado el neutralizante (tiosulfato de sodio).**

Para llevar a cabo el ensayo con monopersulfato de potasio, se usó la misma técnica descrita en los ítems anteriores, los mismos tiempos y las mismas variables. **Al no poder evaluarse la acción fungicida por el gran desarrollo de UFC de *A. fumigatus* en las cajas de Petri, fueron reiteradas las pruebas elevándole el tiempo de contacto del desinfectante durante 1 hora al principio y a las 10 horas posteriormente.**

5.4.4- Ensayo completo del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* (Técnica convencional).

5.4.4.a- Recuento de las UFC en placas con *A. fumigatus*.

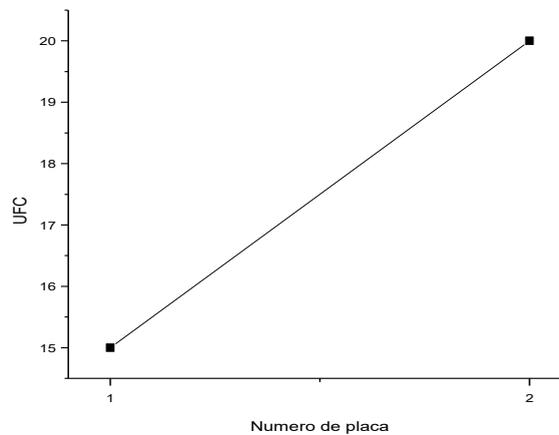


Fig. 134. ascenso de la curva desde la placa 1 a la placa 2.

5.4.4.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus*.

Debido al gran desarrollo de *A. fumigatus* en placa, no fue posible realizar el recuento de UFC por lo que no pudo evaluarse la acción fungicida del monopersulfato de potasio en los tiempos convencionales.

5.4.4.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo "A" y a una dilución de *A. fumigatus*.

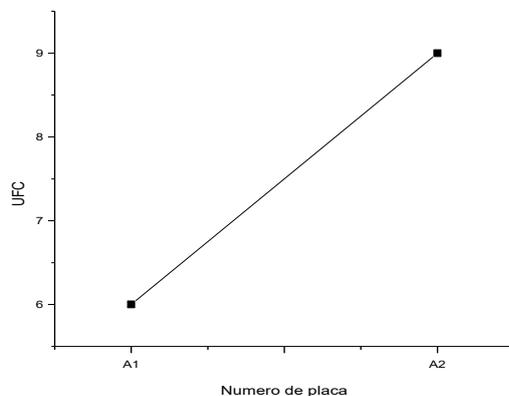


Fig. 135. El efecto del neutralizante muestra una curva ascendente desde la placa A1 a la placa A2.

5.4.4.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de *A. fumigatus*.

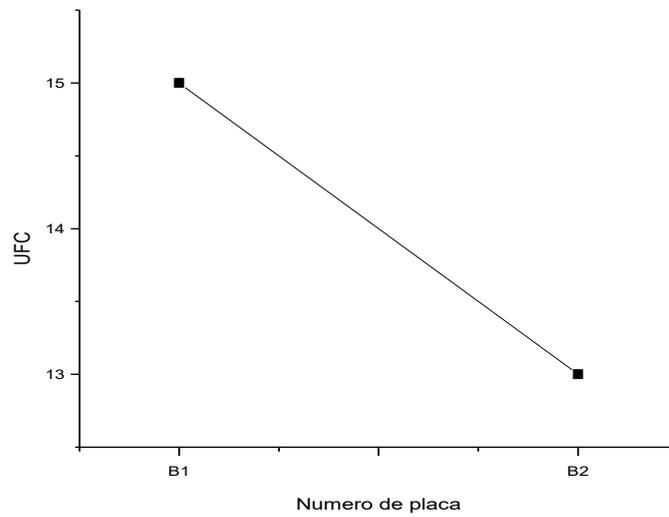


Fig. 136. La acción del neutralizante (tubo B) denota una curva descendente desde la placa B1 a la placa B2.

5.4.4.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio (bicarbonato de sodio) en relación a los tubos A y B y una dilución de *A. fumigatus*.

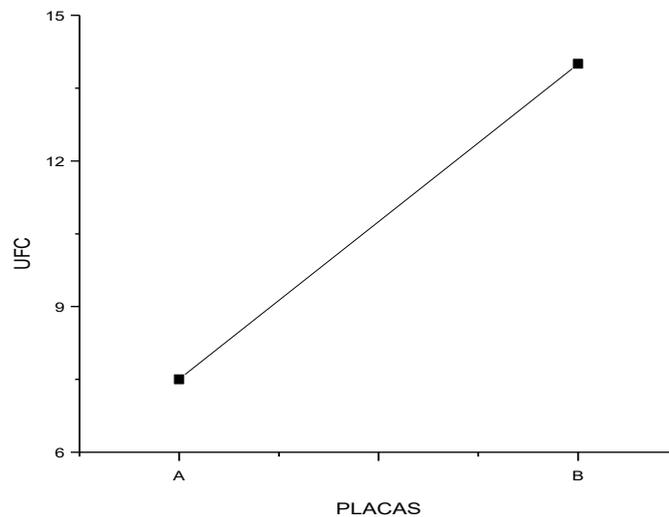


Fig. 137. Los valores medios del neutralizante indican un aumento de la curva desde las placas “A” a las “B”.

5.4.5- Ensayo completo con modificación del tiempo de contacto del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* (1 hora).

5.4.5.a- Recuento de las UFC en placas con *A. fumigatus*.

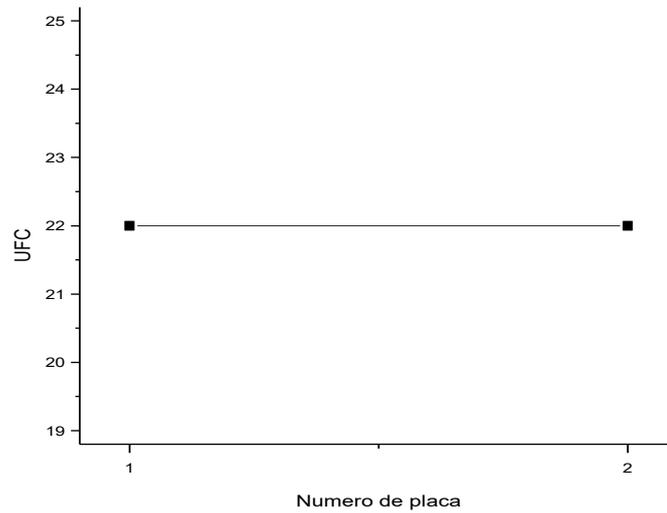


Fig. 138. El desarrollo de UFC en ambas placas arroja un igual resultado.

5.4.5.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus*.

Debido al gran desarrollo de *A. fumigatus* en placa, no fue posible realizar el recuento de UFC por lo que no pudo evaluarse la acción fungicida del monopersulfato de potasio en 1 hora.

5.4.5.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo "A" y a una dilución de *A. fumigatus*.

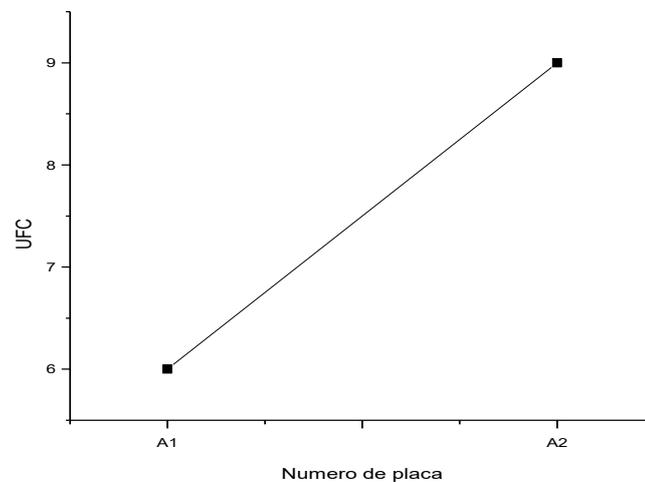


Fig. 139. Incremento de las UFC en la placa A2 con respecto a la placa A1.

5.4.5.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de *A. fumigatus*.

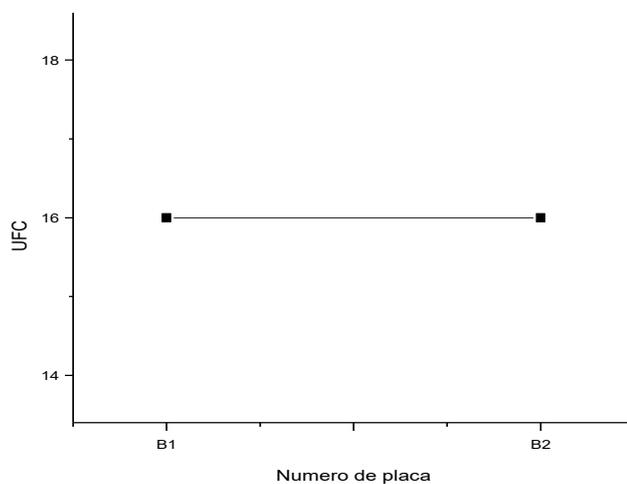


Fig. 140. Acción del neutralizante sobre el tubo B y su posterior siembra en placa. Puede observarse un efecto similar en ambas placas.

5.4.5.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio(bicarbonato de sodio) en relación a los tubos A y B y una dilución de *A. fumigatus*.

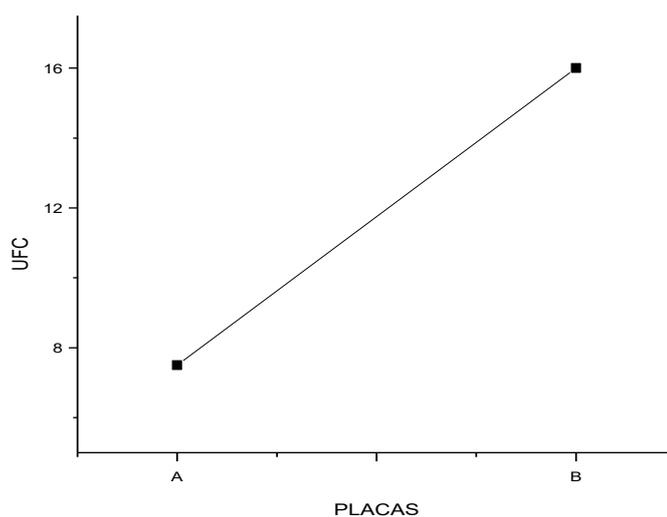


Fig. 141. Moderado incremento de las UFC del valor medio de las placas B en comparación con las placas A.

5.4.6- Ensayo completo con modificación del tiempo de contacto del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* (10 horas).

5.4.6.a- Recuento de las UFC en placas con *A. fumigatus*.

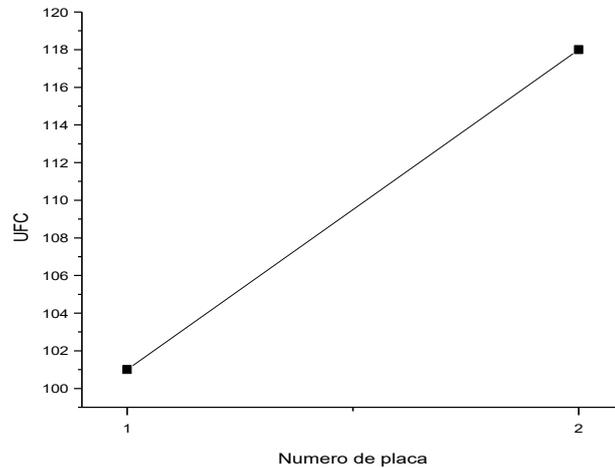


Fig. 142. incremento en el desarrollo de las UFC en la placa 2 en relación a la placa 1.

5.4.6.b- Efecto del monopersulfato de potasio sobre el *A. fumigatus*.

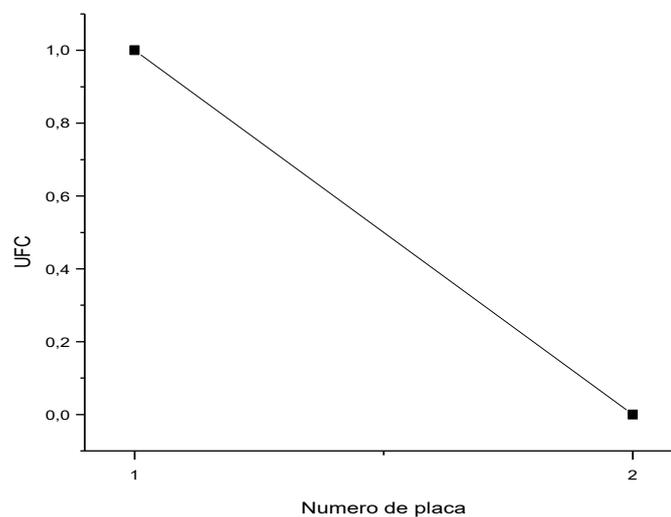


Fig. 143. Desarrollo de las UFC tras la acción del desinfectante sobre *A. fumigatus*.
Descenso de la curva desde la placa 1 a la 2.

- ❖ **De acuerdo a los diferentes ensayos realizados se logró acción fungicida del monopersulfato de potasio a las 10 horas de contacto. Este resultado no es coincidente con las especificaciones establecidas en las normas AFNOR.**

5.4.6.c- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “A” y a una dilución de *A. fumigatus*.

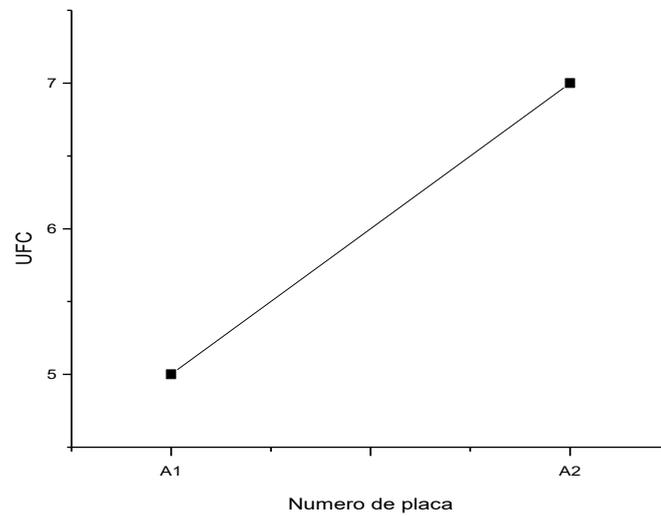


Fig. 144. leve aumento de las UFC en la placa A2 en relación a la placa A1.

5.4.6.d- Efecto del neutralizante del monopersulfato de potasio en relación al tubo “B” y a una dilución de *A. fumigatus*.

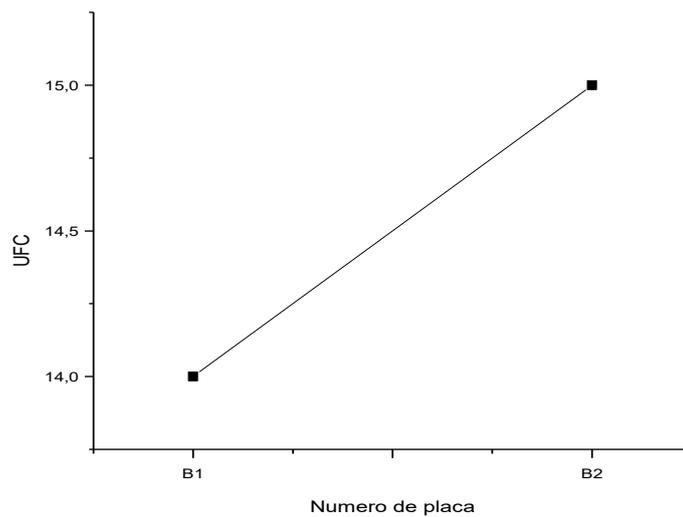


Fig. 145. La curva indica un incremento de las UFC de la placa B2 en comparación con la B1.

5.4.6.e- Comparación del valor medio del neutralizante para monopersulfato de potasio (bicarbonato de sodio) en relación a los tubos A y B y una dilución de *A. fumigatus*.

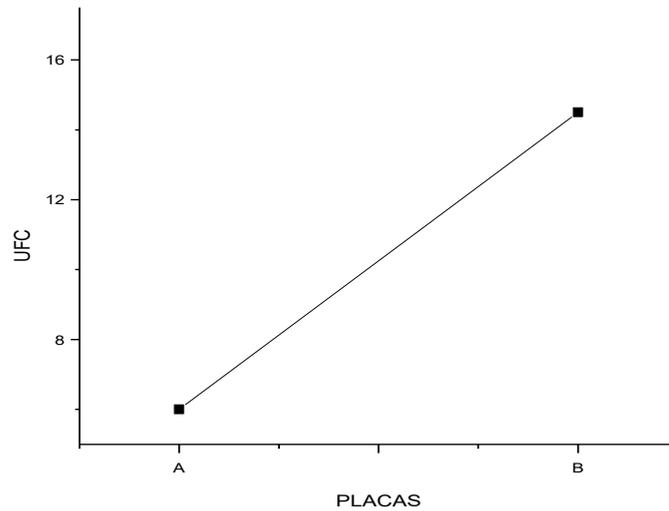


Fig. 146. Ante la acción del neutralizante se observa una marcada disminución en las placas A.

- ❖ **Los resultados obtenidos demostraron que el monopersulfato de potasio interrumpió su acción al ser aplicado el neutralizante (bicarbonato de sodio).**

6- Discusión:

Al analizar el efecto microbicida del hipoclorito de sodio (NaClO) y del monopersulfato de potasio (KHSO₅) sobre los microorganismos más frecuentes en ambientes odontológicos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* y *Aspergillus fumigatus*) se empleó in vitro el método de dilución- neutralización; utilizando las suspensiones bacterianas, los desinfectantes y los neutralizantes, los que fueron identificados para anular la acción de cada agente químico. Respecto a este aspecto se ha hallado que la actividad antibacteriana/antifúngica de los desinfectantes analizados ha dependido del microorganismo sobre el que actúen; como así también de la temperatura y del tiempo de acción.

En lo referente al *S. aureus* ante la acción del (NaClO) se comprobó el efecto bactericida en 5 minutos a 20° C, no observando desarrollo sobre la superficie de las placas de Petri. Este dato obtenido es coincidente con un estudio realizado por la fundación Centro de Estudios Infectológicos (FUNCEI) en el cual se emplearon 5 desinfectantes para la reducción bacteriana demostrando la efectividad del hipoclorito de sodio sobre este microorganismo ⁽⁴³⁾.

Pardo Hernández, D. en un estudio sobre susceptibilidad bacteriana con cuatro soluciones germicidas encontró que el hipoclorito de sodio destruye bacterias vegetativas, micobacterias, virus, hongos y bacterias esporuladas ⁽⁴⁴⁾. Un comportamiento similar se encontró en esta investigación sobre *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *E. coli*.

También se comprobó la acción fungicida del hipoclorito de sodio sobre *A. fumigatus*, observando el desarrollo de pocas colonias sobre las placas. Una publicación del Brazilian Journal of Microbiology describe una menor eficacia del hipoclorito de sodio en contraposición a los resultados utilizando clorhexidina-cetrimida, cloruro de benzalconio y el derivado de clorofenol contra *A. fumigatus* aislado en diferentes ambientes. Los resultados de ese trabajo demostraron que el clorhexidine inhibía inmediatamente las cepas fúngicas, al igual que los derivados fenólicos que presentaban igual efecto fungicida en el mismo período de tiempo (5 minutos); mientras que para lograr la destrucción de esporas con hipoclorito de sodio en 5 minutos debían elevarse las concentraciones mínimas ⁽⁴⁵⁾.

Xavier M.O y Col. en el año 2009 expresan que el Hipoclorito de sodio utilizado al 0.5 % no presenta una buena respuesta fungicida frente a *A. fumigatus* y *A. niger*. Sin embargo otros autores demostraron la actividad microbicida del hipoclorito de sodio sobre cepas de *Salmonella* spp, *E. coli*. y *A. fumigatus*. Al respecto, se obtuvo el mismo dato en relación a los dos últimos microorganismos mencionados. En aquel estudio utilizado para las dos cepas se observó el desarrollo de colonias en un número estadísticamente significativo: $p \leq 0,01$ con una reducción del 99,99 % de inactivación en un tiempo de 5 minutos. En el año 2012, Moncada Barragán J.L con

el agregado de ácido peracético comprobó que la reducción resultaba igual pero el tiempo se disminuía a 1 minuto de exposición.

Recientemente (2019) Reynolds Kelly et al. Demostraron la eficacia del hipoclorito de sodio al 2,4 % sobre cepas de *A. fumigatus* y *Clamidosporum*. Observando que el efecto obtenido sobre *A. Fumigatus* causó una reducción del 95,8 % de las colonias. Estos resultados muestran una coincidencia con los hallazgos del presente estudio.

García Robles JM y col. coinciden con el dato del presente trabajo respecto al tiempo de acción de los desinfectantes a partir de un estudio que le permitió evaluar la disminución de la carga microbiana de *E. coli* en diferentes tiempos (0, 10, 20, 30 y 60 minutos) ⁽⁴⁶⁾.

Al evaluar el efecto del (KHSO₅) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* durante el mismo tiempo y a la misma temperatura se comprobó su acción bactericida por observación de las placas sin desarrollo.

En el caso de *Acinetobacter baumannii*, el monopersulfato de potasio tuvo una acción similar; sin embargo las placas mostraron desarrollo de colonias.

En el año 2012, la Lic. Alejandra Castilla hace referencia a efectos bactericidas similares a los hallados en este estudio, estableciendo que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* y *Mycobacterium smegmatis* son inhibidos por la acción del (KHSO₅) ⁽⁴⁷⁾.

Una situación surgida en Colombia que motivó un estudio del comité de infecciones del Hospital Universitario San José ante reiterados brotes de *Acinetobacter baumannii* impulso la búsqueda de reservorios y la implementación de un conjunto de acciones tendientes a mejorar las medidas de asepsia cambiando el desinfectante de rutina. El reemplazo de este último por una solución de monopersulfato de potasio para la limpieza y desinfección de superficies disminuyeron los brotes por el microorganismo en cuestión ⁽⁴⁸⁾.

Sobre *S. aureus* y *E. coli* se halló que el monopersulfato de potasio al 1% ejercía actividad microbicida. La misma concentración sobre esporas fúngicas no originaba un efecto completo según referencia de Stella Maimone ⁽⁴⁹⁾.

En el año 2017 Tomoko Matsuoka et al. evaluaron la acción del monopersulfato de potasio sobre *Pseudomonas aeruginosa* a nivel clínico, demostrando que resultaba muy eficaz después de un tiempo de 30 minutos de contacto con las superficies de trabajo ⁽⁵⁰⁾.

Una actualización sobre desinfectantes realizada por la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, también ha referido que el monopersulfato de potasio al 1% en 5 minutos de contacto presentaba acción microbicida sobre *E. coli*, *S. aureus* y poliovirus ⁽⁵¹⁾.

Teniendo en cuenta el análisis realizado en esta investigación sobre el monopersulfato de potasio y su efecto sobre *A. fumigatus* si bien se respetaron las variables tiempo y temperatura según el protocolo de trabajo no se comprobó la acción fungicida. En esta situación se desarrollaron placas con formación de colonias imposibilitando el recuento. En base a este hallazgo se elevó el tiempo de contacto del KHSO₅ a 1 hora. Aun así no pudo efectivizarse el recuento por el excesivo desarrollo. A partir de aquí se fueron evaluando distintos tiempos de contacto del desinfectante sobre *A. fumigatus* hasta alcanzar las 10 horas. En este último caso pudo operativizarse el recuento y por ende comprobar que en ese rango realmente posee acción fungicida.

Sin referencia al factor tiempo en un boletín de actualización del Comité de Control de IACS perteneciente al Hospital Posadas de la República Argentina se menciona la acción fungicida del Monopersulfato de potasio.

Diferentes trabajos manifiestan la eficacia de trabajar con composiciones de monopersulfato de potasio en diferentes microorganismos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chlorella*, *Spirogyra*, *Oscillatoria*, *Vaucheria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pullularia*, *Flavobacterium* y *Rhizopus*), sin especificar los tiempos de contacto del desinfectante sobre cada uno de ellos. De allí que este ítem ha motivado la consulta en diferentes prospectos y hojas de ruta de formulaciones de KHSO₅.

En lo atinente al tiempo de contacto, González Salgado A, demostró que si es aplicado al 1% la destrucción de esporas ocurría entre los 5 y 10 minutos ⁽⁵²⁾.

Chih M, Gerhold R, Labine P y Fan G reportan que ciertos géneros de hongos como *Aspergillus* y el *Candida Saccharomyces* resultan inhibidos por la acción del monopersulfato de potasio, sin especificar el tiempo de contacto con el desinfectante ⁽⁵³⁾.

6.1- Importancia clínica y recomendaciones desde bioseguridad.

El presente estudio ha apuntado a que el profesional odontólogo adquiera en base científica conocimientos para la selección y procedimientos oportunos cuando deba utilizar un desinfectante y así contar con una herramienta esencial para evitar la diseminación de agentes infecciosos.

Se sabe que las infecciones asociadas a la atención de salud siguen siendo un problema trascendental en el ámbito público y privado. El incremento de pacientes con alta susceptibilidad a las infecciones, la aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos, la complejidad en las intervenciones realizadas y los procedimientos invasivos; hacen muy difícil la eliminación y reducción a cero ⁽⁵⁴⁾.

Cada paciente está expuesto a una gran y particular variedad de agentes microbianos durante la consulta o intervención odontológica. El contacto entre el paciente y tales

agentes no producen necesariamente una enfermedad clínica, ya que hay otros factores que influyen en la naturaleza y frecuencia de las infecciones nosocomiales. Pero, puede llevar a la colonización y a la diseminación de estos patógenos con incidencia epidemiológica en la sociedad ⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾. También es de destacar que la infección puede ser transmitida por un objeto inanimado o por sustancias recién contaminadas provenientes de otro foco humano de infección (infección cruzada).

La utilización del máximo nivel de desinfección posible durante toda la atención es fundamental para reducir tanto la transmisión cruzada de enfermedades como cualquier infección asociada a la atención odontológica ⁽⁵⁷⁾.

En los ambientes de atención odontológica suele surgir la pregunta: ¿ De qué manera proceder a la selección del mejor desinfectante y de la concentración adecuada? Como respuesta a este interrogante una cuestión a tener en cuenta es realizar una caracterización de los microorganismos presentes en cada área, con la finalidad de conocer la carga microbiana propia de cada ambiente y superficie.

También es importante en caso de emplearse un nuevo desinfectante o de intentar cambiar la concentración realizar una evaluación para verificar su efectividad ⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾.

Surge que si bien se trabaja constantemente en aspectos ambientales, avances y actualizaciones en el tema de los desinfectantes, estos aspectos son válidos cuando se cuenta con la concientización del personal de salud sobre el uso racional de los mismos.

Al trabajar analizando el efecto microbicida del hipoclorito de sodio (NaClO) y del monopersulfato de potasio (KHSO₅) sobre los microorganismos más frecuentes presentes en ambientes odontológicos ha arrojado datos para poder seleccionar adecuadamente que desinfectante presenta las mejores condiciones, para reducir al máximo la contaminación y propagación de infecciones. Los resultados obtenidos han pretendido aumentar los conocimientos sobre la temática seleccionada y dejar abierto el espacio para futuras investigaciones.

7- Conclusiones

- Las pautas experimentales en un ensayo deben establecerse considerando las condiciones reales.
- Al analizar un desinfectante deben tenerse en cuenta las especificaciones del fabricante (tiempo- temperatura-microorganismo).
- El método dilución – neutralización y el empleo de las normas AFNOR resultan confiables para evaluar la actividad microbica de un desinfectante.
- El NaClO ejerce acción microbica sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* y *Aspergillus fumigatus*.
- El KHSO₅ posee acción bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*.
- La acción fungicida del KHSO₅ se logra elevando el tiempo de contacto a 10 horas.
- No se halló acción del KHSO₅ en intervalos de tiempo menores a 10 horas.
- Conocer el mejor desinfectante en cada instancia particular; la acción microbica; las concentraciones de las soluciones; el tiempo de exposición; la preparación; el almacenamiento y las indicaciones del fabricante optimizan los resultados esperados.
- Los resultados sobre la acción microbica del NaClO y del KHSO₅ fue evidenciada en hallazgos previos. Las diferencias encontradas en esta investigación se refieren al tiempo de contacto entre el microorganismo y el desinfectante.
- A nivel clínico/hospitalario el control microbiano es un desafío.

- La generación de conocimientos sobre el tema contribuiría a que los ambientes de salud posean áreas especializadas (Bioseguridad) con protocolos de trabajo para reducir contaminación e infección.
- La aplicabilidad de los resultados y conocimientos resultaría inútil sin la formación de los recursos humanos en ambientes clínico/hospitalarios.

8- Anexo.

8.1- Resultados (datos cuantitativos)

Para el caso de las suspensiones bacterianas/fúngicas:

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada microorganismo, se realizó el recuento de colonias sobre la superficie de cada placa (original= Placa 1 y duplicado= Placa 2) y se obtuvo el valor medio al que se denominó **(R)**.

Para el caso de los neutralizantes:

Cumplimentado el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias, obteniendo el valor medio de las dos placas con agua destilada (original= Placa A1 y duplicado= Placa A2) al que se denominó **(C)** y el valor medio de las dos placas con desinfectante (original= Placa B1 y duplicado= Placa B2), denominado **(N)**.

Para comprobar la efectividad del neutralizante se tuvo que cumplir que al menos el 50% de los microorganismos estén protegidos, es decir: $N \geq 0.5 C$.

Para el caso de los desinfectantes:

Luego de realizar la incubación de acuerdo a cada microorganismo, se realizó el recuento de colonias de cada placa (original=Placa A1 y duplicado= Placa A2), obteniendo el valor medio al que se denominó **(D)**.

Para considerar que una concentración de desinfectante sea microbicida, se tuvo que producir una reducción de 10^5 en el número de microorganismos, es decir: $D \leq (C/10)$.

Para realizar el cálculo de la reducción logarítmica fue necesario tener en cuenta los datos obtenidos en el recuento de la suspensión microbiana realizado durante las diluciones hasta un total de 10^{-6} . Por lo tanto el valor inicial de la suspensión es $C \times 10^6$, que sufrió dos diluciones, la primera de 1/10 para el desinfectante y la segunda de 1/10 para el neutralizante por lo que quedaría $C \times 10^4$.

En relación a lo descripto anteriormente, la reducción logarítmica se calculó de la siguiente forma:

$$\log. (C \times 10^4) - \log D$$

Análisis del efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *E. coli*:

Recuento:

Placa 1: 414

Placa 2: 425

Media: 419.5 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: $0 = D$

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$0 \leq (203/10)$

$0 \leq 20.3$ (por lo tanto es bactericida)

Neutralizante:

Placa A1: 234

Placa A2: 172

Media: $203 = C$

Placa B1: 180

Placa B2: 170

Media: $175 = N$

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$175 \geq 0.5 \cdot 203$

$175 \geq 101.5$

Para calcular la reducción logarítmica:

$\text{Log}(cx10^4) - \log d$

$\text{Log}(203 \times 10000) - \log 0$

$\text{Log}(2030000) - \log 0$

6.30-0

En este caso redujo 6.30 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *S. aureus*:

Recuento:

Placa 1: 208

Placa 2: 274

Media: 241 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = **D**

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$0 \leq (291/10)$$

$$0 \leq 29.1 \text{ (por lo tanto es bactericida)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 216

Placa A2: 366

Media: 291 = **C**

Placa B1: 316

Placa B2: 311

Media: 313.5 = **N**

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$313.5 \geq 0.5 \cdot 291$$

$$313 \geq 145.5$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log } (cx10^4) - \text{log } d$$

$$\text{Log } (291 \times 10000) - \text{log } 0$$

$$\text{Log } (2910000) - \text{log } 0$$

$$6.46 - 0$$

En este caso redujo 6.46 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *S. aeruginosa*.

Recuento:

Placa 1: 206

Placa 2: 255

Media: 230.5 = R

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = D

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$0 \leq (133/10)$$

$$0 \leq 13.3 \text{ (por lo tanto es bactericida)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 143

Placa A2: 123

Media: 133 = C

Placa B1: 125

Placa B2: 131

Media: 128 = n

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$128 \geq 0.5 \cdot 133$$

$$128 \geq 66.5$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log } (cx10^4) - \text{log } d$$

$$\text{Log } (133 \times 10000) - \text{log } 0$$

$$\text{Log } (1.330.000) - \text{log } 0$$

$$6.12 - 0$$

En este caso redujo 6.12 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del hipoclorito de sodio sobre *A. baumannii*:

Recuento:

Placa 1: 481

Placa 2: 571

Media: 526 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = **D**

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$0 \leq (910/10)$$

$$0 \leq 91 \text{ (por lo tanto es bactericida)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 880

Placa A2: 940

Media: 910 = **C**

Placa B1: 856

Placa B2: 888

Media: 872 = **n**

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$872 \geq 0.5 \cdot 910$$

$$872 \geq 455$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log } (c \times 10^4) - \text{log } d$$

$$\text{Log } (910 \times 10000) - \text{log } 0$$

$$\text{Log } (9100000) - \text{log } 0$$

6.95-0

En este caso redujo 6.95 en vez de 5

Análisis del efecto fungicida del hipoclorito de sodio sobre *A. fumigatus*:

Recuento:

Placa 1: 92

Placa 2: 105

Media: 98.5 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 1

Placa A2: 2

Media: 1.5 = **D**

Para que sea FUNGICIDA tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$1.5 \leq (83.5/10)$$

$$1.5 \leq 8.35 \text{ (por lo tanto es FUNGICIDA)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 73

Placa A2: 94

Media: 83.5 = **C**

Placa B1: 261

Placa B2: 255

Media: 258 = **n**

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$258 \geq 0.5 \cdot 83.5$$

$$258 \geq 41.75$$

Para calcular la reducción logarítmica:

Log (cx10⁴)- log d

Log (83.5X10000) – log 1.5

Log (835000)-log 1.5

5.92-0.17

En este caso redujo 5.75 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del monopersulfato de potasio sobre *E. coli*:

Recuento:

Placa 1: 455

Placa 2: 423

Media: 439 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = **D**

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$0 \leq (284/10)$

$0 \leq 28.4$ (por lo tanto es bactericida)

Neutralizante:

Placa A1: 288

Placa A2: 280

Media: 284 = **C**

Placa B1: 221

Placa B2: 220

Media: 220.5 = **N**

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$220 \geq 0.5 \cdot 284$

$220 \geq 142$

Para calcular la reducción logarítmica:

Log (cx10⁴)- log d

Log (284 x10000) – log 0

Log (2840000)-log 0

6.45-0

En este caso redujo 6.45 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del monopersulfato de potasio sobre *S. aureus*:

Recuento:

Placa 1: 570

Placa 2: 493

Media: 531.50 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = **D**

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10⁵. Es decir $D \leq (C/10)$

$0 \leq (250/10)$

$0 \leq 25$ (por lo tanto es bactericida)

Neutralizante:

Placa A1: 242

Placa A2: 258

Media: 250 = **C**

Placa B1: 255

Placa B2: 211

Media: 233 = **n**

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$233 \geq 0.5 \cdot 250$$

$$233 \geq 125$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log } (c \times 10^4) - \log d$$

$$\text{Log } (250 \times 10000) - \log 0$$

$$\text{Log } (2500000) - \log 0$$

$$6.39 - 0$$

En este caso redujo 6.39 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del monopersulfato de potasio sobre *P. aeruginosa*:

Recuento:

Placa 1: 265

Placa 2: 286

Media: 275.5 = **R**

Desinfectante:

Placa A1: 0

Placa A2: 0

Media: 0 = **D**

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$0 \leq (269.5/10)$$

$$0 \leq 26.95 \text{ (por lo tanto es bactericida)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 286

Placa A2: 253

Media: 269.5 = **C**

Placa B1: 246

Placa B2: 264

Media: $255 = n$

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$255 \geq 0.5 \cdot 269.5$$

$$255 \geq 134.75$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log } (cx10^4) - \text{log } d$$

$$\text{Log } (269.5 \times 10000) - \text{log } 0$$

$$\text{Log } (2.695.000) - \text{log } 0$$

$$6.43 - 0$$

En este caso redujo 6.43 en vez de 5

Análisis del efecto bactericida del monopersulfato de potasio sobre *A. baumannii*:

Recuento:

Placa 1: 391

Placa 2: 429

Media: $410 = R$

Desinfectante:

Placa A1: 4

Placa A2: 1

Media: $2.5 = D$

Para que sea bactericida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$2.5 \leq (122.5/10)$$

$$2.5 \leq 12.25 \text{ (por lo tanto es bactericida)}$$

Neutralizante:

Placa A1: 136

Placa A2: 109

Media: $122.5 = C$

Placa B1: 371

Placa B2: 308

Media: $339.5 = n$

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$339.5 \geq 0.5 \cdot 122.5$$

$$339.5 \geq 61.25$$

Para calcular la reducción logarítmica:

$$\text{Log}(cx10^4) - \log d$$

$$\text{Log}(122.5 \times 10000) - \log 2.5$$

$$\text{Log}(1225000) - 0.39$$

$$6.08 - 0.39$$

$$5.69$$

En este caso redujo 5.69 en vez de 5

Análisis del efecto fungicida del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus*:

Recuento:

Placa 1: 15

Placa 2: 20

Media: $17.5 = R$

Desinfectante:

No se puede contabilizar debido al gran desarrollo.

Para que sea fungicida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

NO ES FUNGICIDA

Neutralizante:

Placa A1: 6

Placa A2: 9

Media: 7.5 = C

Placa B1: 15

Placa B2: 13

Media: 14 = n

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$14 \geq 0.5 / 7.5$$

$$14 \geq 3.75$$

Para calcular la reducción logarítmica:

Log (cx10⁴)- log de incontable

Log (7.5x10000) – log de incontable

Log (75000)-log de incontable

4.87- incontable

NO PUEDE PRECISARSE CUAL ES LA REDUCCION LOGARITMICA.

Modificación del ensayo:

Como no pudo evaluarse la acción fungicida del monopersulfato de potasio sobre el *A. fumigatus* en los tiempos estipulados de acuerdo al protocolo de trabajo fueron reiteradas las pruebas, pero en este caso se elevó el tiempo de contacto del desinfectante durante 1 hora y a las 10 horas.

Análisis del efecto fungicida del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* (tiempo de contacto 1 hora).

Recuento:

Placa 1: 22

Placa 2: 22

Media: 22 = R

Desinfectante:

No se puede contabilizar debido al gran desarrollo.

Para que sea fungicida tiene que haber una reducción de 10⁵. Es decir $D \leq (C/10)$

NO ES FUNGICIDA

Neutralizante:

Placa A1: 6

Placa A2: 9

Media: $7.5 = C$

Placa B1: 16

Placa B2: 16

Media: $16 = n$

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$16 \geq 0.5 / 7.5$$

$$16 \geq 3.75 \text{ (El neutralizante es efectivo)}$$

Para calcular la reducción logarítmica:

Log ($cx10^4$)- log de incontable

Log ($7.5x10000$) – log de incontable

Log (75000)-log de incontable

4.87- incontable

NO PUEDE PRECISARSE CUAL ES LA REDUCCION LOGARITMICA.

Análisis del efecto fungicida del monopersulfato de potasio sobre *A. fumigatus* (tiempo de contacto 10 horas).

Recuento:

Placa 1: 101

Placa 2: 118

Media: $109.5 = R$

Desinfectante:

Placa 1: 1

Placa 2: 0

Media: $0.5 = D$

Para que sea fungicida tiene que haber una reducción de 10^5 . Es decir $D \leq (C/10)$

$$0.5 \leq (6/10)$$

$0.5 \leq 0.6$ (por lo tanto es fungicida)

Neutralizante:

Placa A1: 5

Placa A2: 7

Media: $6 = C$

Placa B1: 14

Placa B2: 15

Media: $14.5 = n$

Para que el neutralizante sea efectivo se tiene que cumplir que al menos el 50% de las células bacterianas sean protegidas. Es decir $N \geq 0.5 C$

$$14.5 \geq 0.5 / 6$$

$14.5 \geq 3$ (por lo tanto el neutralizante es efectivo)

Para calcular la reducción logarítmica:

$\text{Log}(cx10^4) - \text{log } d$

$\text{Log}(6 \times 10000) - (-0.30)$

$\text{Log}(60000) - (-0.30)$

$4.8 - (-0.30)$

5.1

En este caso redujo 5.1 en vez de 5

9- Bibliografía:

- 1- Álvarez N, Buj G, Castillo F *et al.* *Infección cruzada en Odontología*. Departamento de Microbiología de la Universidad de Oviedo, España. 2016; 2- 9.
- 2- Zambrano Gari CC, Luna Fontalvo JA. Diversidad microbiana presente en el ambiente de la clínica odontológica de la Universidad del Magdalena. *Rev. Intrópica*. 2013; (8): 61- 8.
- 3- Kumar S, Atray D, Paiwal D, Balasubramanyan G, Duraiswamy P, Kulkarni S. Dental unit waterlines: source of contamination and cross-infection. *Journal of Hospital Infection*. 2010; 74: 99- 111.
- 4- López Cerero L. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin*. 2014; (32): 4-14.
- 5- Serrano Coll HA, Sánchez Jiménez M, Cardona Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES odont*. 2015; 28 (2): 112-18.
- 6- Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiote. *Adv Exp Med boil*. 2016; 902: 45-60.
- 7- Ávila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA. Cell Biol*. 2009; 28 (8):405-14.
- 8- Butler T. Evaluación de la adherencia del biofilm sobre salivaderas dentales de acero inoxidable, cerámica y opalina. Tesis doctoral. 2008; 150- 51.
- 9- Torres García JD. Estudio microbiológico de las superficies de trabajo de los cubículos de la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de las Américas. Trabajo de Tesis de odontología. 2015; 31- 41.
- 10- Pasquarella C, Veronesi L, Castiglia P, Liguori G, Montagna M, Napoli C *et al.* Italian multicentric study on microbial environmental contamination in dental clinics: a pilot study. *Science of the Total Environment*. 2010; 408: 4045- 4051.
- 11- Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera C, Monistrol NO. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae*: *Epidemiology and control*. *Clin. Infect. Dis*. 2011; 52: 743- 49.
- 12- Abreu AC, Tavares RR, Borges A, Merguhao F, Simoes M. Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. *J Antimicrob. Chemoter*. 2013; 68: 2718-32.

- 13-Otter J, Yezli S, French L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens . *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 2011; 32 (7): 687- 99.
- 14-Almatorudi A. Staphylococcus aureus dry –surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *Journal of Hospital Infection.* 2016; (3): 233- 45
- 15-Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R et al. Staphylococcus coagulasa negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Rev Chilena Infectol.* 2013; 30: 480- 8.
- 16-Reginald B, Hait J, Tallent S. Staphylococcus aureus. *Guide to Foodborne Pathogens.* Julio 2016; 7- 12. disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118684856.ch2>
- 17-<http://www.insht.es>. España. INSST Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Notas Técnicas de Prevención 376, 585, 616, 689, 700, 771, 805, 806, 821, 822, 858. Actualizado en abril 2012. Disponible en: <http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.a82abc159115c8090128ca10060961ca/?vgnnextoid=db2c46a815c83110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD>
- 18-Eriksen HM, Dimitrov V. Ecology and oral health a complexity perspectiva. *European Journal of oral Health Sciences.* 2003; 11 (4): 285.
- 19-Hirsh EB, Vincent H. Impact of multidrug resistance Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoen outcomes.* 2013; 11 (3): 441-51
- 20-Hidalgo Castellón A. Lesión ocupante de espacio cerebral en paciente inmunodeprimida. En: Luque Márquez R, Editor. *Casos Clínicos SAEI de enfermedades infecciosas para residentes.* Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 2015; 59- 62.
- 21-Vanegas Múnica JM, Roncancio Villamil G, Jiménez Quiceno JN. Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev CES Med.* 2014; 28(2): 233-246.
- 22-Martínez Álvarez E. Vigilancia epidemiológica comunitaria en las entidades territoriales departamentales y distritales de Colombia. *Inf. Quinc Epidem Nac.* 2013; 18 (10): 111-120.
- 23-Pedro M, Salim M. Mutación en el gen gyrA de aislamientos hospitalarios de Acinetobacter baumannii en Montería, Colombia. *Infectio.*2010. p. 97-104
- 24-Morales C, Gomez AF et al. Infección en pacientes quemados del Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, Colombia. *Rev. Colom. Cir.* 2010; 25: 267- 75.

- 25-Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M et al. Epidemic prolife of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. Dec. a let. food epidemic. 2011; 365 (19):1771- 80.
- 26-Pardi C, Mata Essayag S; Colella M; Roselló A. Micosis de la cavidad bucal. Revisiones bibliográficas parte II. 2013; 51 (4): 2.
- 27-Curbello J, Galván JM, Aspa J. Actualización sobre *Aspergillus*. *Pneumocystis* y otras micosis pulmonares oportunistas. *Archivos de Bronconeumología*. 2015; 51 (12): 57- 60.
- 28-Avanza JR, Sábada B, Gómez Guíu A. Farmacología de los antifúngicos en el tratamiento de la aspergilosis. *Rev. iber. de micolog*. 2014; 31 (4): 255:261.
- 29-Hope TJ, Walsh DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Review article *Lancet Infect Dis*. 2005; 5 (10): 609-622.
- 30-Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergillosis. Clinical Forms and treatment . *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012; 30 (4): 201-8.
- 31-Kahrs, R.F. Principios generales de desinfección. *Rev.sci.tech. Off. int. Epiz*. 1995. 14:1, 143-163.
- 32-Wigginton KR, Tamar K. Virus disinfection mechanisms: the rol of virus composition, structure and function. *Pubmed*. 2012; 12-16.
- 33-Russel HA et al. Evaluación de la eficacia antimicrobiana. En: Fraise A, Maillard J, Sattar S, Editores. *Principles and practice of disinfection, preservations and sterilization*. 5º edic. 2013. Oxford. Blackwell Science Ltd. 236-246.
- 34-Álvarez Alcántara A , Espigares Rodriguez E, Gálvez Vargas R. Valoración de desinfectantes. Método de dilución –neutralización. *Hig. San. Amb*. 2001; 1: 1-5.
- 35-Guevara Lizarazu D. Efecto De Diferentes Concentraciones De Hipoclorito De Sodio Como Irrigante Endodóntico Sobre Propiedades Físicas De La Dentina. Una Revisión De La Literatura. Tesis de la especialidad en Endodoncia. 2014; 6: 24-6.
- 36-Zaparolli PCS D, Cruz-Filho A. Effect of sodium hypochlorite and EDTA Irrigation, Individually and in alternation, on dentin microhardness at the furcation area or mandibular molars. *Brazilian Dental Journal*. 2012; 23(6):654-8.

- 37-Nohayati L, Hany Mohamed AA. The antibacterial activity of sodium hypochlorite and clorehexidine against *Enterococcus faecalis*: a review of agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent*. 2013, 16 (1): 9-16.
- 38-Haapasalo M et al. Irrigation in Endodontics. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU. Institutos Nacionales de Salud. *Pub Med*. 2014; (6): 299-303.
- 39- Poggio C, Dagna A, Arciola CR, Visai L. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite based solution. *The International Journal of artificial organs*. 2010; 33 (9): 654-9.
- 40-Bangher M, Gené C, González R, Pindat L. Desinfectantes de interés médico. Libro informativo. Facultad de Medicina UNNE. 2016; 16.
- 41-Environmental Protection Agency. Estados Unidos. C2017. [citado 12 nov. 2018] disponible en: http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/avian_flu_products.htm#activ
- 42-Maimone S. Limpieza y Desinfección de Superficies en el Ambiente Hospitalario. CODEINEP. 2009, 9-12.
- 43-Julián Stambullian, Daniel Rossotti et al. Eficacia de cinco desinfectantes para la reducción bacteriana doméstica. Fundación Centro de Estudios Infectológicos (FUNCEI). 2011, vol.71 no.3.
- 44-Pardo Hernández D. Susceptibilidad bacteriana frente a cuatro soluciones germicidas. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista. 2014; 37, 41, 42,56 y 60.
- 45-Mattei A, Santin R, Schuch L, Meireles L. Actividad *in vitro* de desinfectantes contra *Aspergillus* spp. *Braz J Microbiol*. 2013; 44 (2): 481-484.
- 46-García Robles J et al. Evaluación de desinfectantes. *Rev Iber Tecnología Post*. 2017; Vol 18 (1):9-16.
- 47-Castilla A. Desinfectantes de uso hospitalario. Grupo asesor de control de infecciones y epidemiología. 2012; 2º Ed. (5): 12-13.
- 48-Arroyave Y, Agudelo H, Roja A. Brote de Infección o Colonización por *Acinetobacter Baumannii*. *Rev. Colom. de Cir*. 2014; 29:42-49.
- 49-Maimone S. Monopersulfato de potasio. Actividad microbicida del monopersulfato de potasio. *Rev. Des. de hosp*. 2018; 1-4.

- 50-Matsuoka T, Yoshida S, Ohashi K, Shinoda Y, Kato M, Mori T, et-al. Evaluation of efficacy and clinical utility of potassium peroxymonosulfate-based disinfectants. *Can. Journ. of infect. cont.* 2017; 32 (2): 93-97
- 51-Romero Crespo I, Gaspar Carreño M, - Achau Muñoz R, Márquez JF. Desinfectantes de ambientes y superficies utilizados en el ámbito sanitario. *Rev. GPS SEFH.* 2017; 12-15.
- 52-González Salgado A. Diagnóstico y control de cepas de *Aspergillus* productoras de toxinas. UCM. 2009; 114-117.
- 53-Chih M, Gerhold R, Labine P y Fan G. Synergistic biocidal combinations. *PCT.* 1996; 11-14.
- 54-Ortega S, Martínez S, Pérez S, Fernández V, Bajac M, García L. Manual y Normas de Bioseguridad. UNNE [Internet]. 2012 [citado 12 de enero del 2012]: 3-5. Disponible en: <http://odn.unne.edu.ar/manbio.pdf> .
- 55-Carter C D, Barr B A. Problemas de control de infecciones en la construcción y renovación. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997; 18 (8): 587 – 596.
- 56-Albinagorta J, Tello J, Burga M, Roncal S, Bellido E, Ramirez P, et al. Manual de Salud Ocupacional. Oficina de Epidemiología y Salud Ambiental [Internet]. 2005 [citado 15 nov. 2018]. 53-57. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v17n4/a09v17n4.pdf>
- 57-Iglesias M, Verdura J, Scull G, Arias M. Comportamiento de la Bioseguridad en un Área de Salud. *Medimay.* 2009; 15 (1): 73-85.
- 58-Barclay L., Park GW, Vega E., Hall A., Parashar U., Vinjé J., Lopman B. Control de infecciones. *Clinica Microbiol. Infectar.* 2014; 20: 731–740.
- 59-López Á, Fernández D, León M, Montes B, Pulido M. Higiene del Medido Hospitalario y Limpieza del Material. MacMillan. 2013; 80.

Bibliografía de consulta:

- 60-Rivera R, Castillo G, Astete M, Linares V, Huanco D. Eficacia de un programa de capacitación en medidas básicas de prevención de infecciones intrahospitalarias. *Rev.Perú Med. Exp Salud Pública.*2005; 22 (2): 88-95.
- 61-Vera Núñez D. Efectividad de Guía de Buenas Prácticas en la bioseguridad hospitalaria. *Revista Cubana de Enfermería* [Internet]. 2017 [citado 2017 Dic 01]; 33(1): [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.revenfermeria.sld.cu/index.php/enf/article/view/1208>.

- 62-Weber B, Rutala W, Sickbert-Bennett E. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51 (12): 4217-24
- 63-Vignoli R. Esterilización, desinfección y asepsia. *Bacteriología y Virología Médica*. 2008 Cap. 33 : 609-29.
- 64-McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-79.
- 65-Rosalía Allier. *Química General*. Segunda Edición. México. Mc Graw-Hill.2010.
- 66-Chang R, Goldsby K. *Química*. 12º Edición. España. McGraw Hill. 2016.
- 67-[http:// www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). USA. CDC. (2009). [Octubre de 2018; Noviembre de 2018]. [Aprox. dos pantallas]. Disponible en: [http:// www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm).
- 68-Drosau A, Falabella A, Kirsner RS. Antiseptics on wounds: An Area of controversy. *Wounds* 2003;15:149- 66.
- 69-Martin MA, Wenzel RP. Esterilización, desinfección y eliminación de desechos infecciosos. En: Mandell, Bennett, Dolin, Mandell, Douglas y Bennett. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*. 4ta ed. Ed. Panamericana. 1995; 2892- 2900.
- 70-Hernández L, Malagón G, Silva J. Antiseptia. En: Malagón, Hernández. *Infecciones hospitalarias*. Colombia. Ed. Panamericana. 1995; 185-227.
- 71-Negróni M. *Microbiología Estomatológica*. 3º Edición. Argentina. Ed. Panamericana. 2018.
- 72-Macchi R. *Introducción A La Estadística En Ciencias De La Salud*. 2º Ed. Argentina. Ed. Panamericana. 2014.
- 73-Sapp P, Eversole L, Wysocki G. *Patología Oral y Maxilo Facial Contemporánea*. 2º Ed. España. Ed. Elsevier. 2010.
- 74-Treacle AM, Thom KA, Furuno JP, et al. Bacterial Contamination of health care worker's white coats. *Am J Infect Control*. 2009; 37(2):101-5.

- 75-Borer, A, Gilad, J, Smolyakov, R, Eskira, S, et al. Cell phones and Acinetobacter transmission. *Emerging infectious diseases*. 2005.11 (7), 1160.
- 76-Hoyos Serrano, M, Gutiérrez Choque, L. N. Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes. *Rev. de Actual. Clínic. Invest.* 2014, 49: p: 2635.
- 77-Tribedi P, Sil AK. Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. *AKS2. J Appl Microbiol.* 2014; 116(2): 295-303.
- 78-Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp.* 2014; 1(3): 14-30.
- 79-Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 2013; 64(1):175-188.
- 80-Plata K, Rosato AE, Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(4): 597-612.
- 81-Ferreira H, Lala ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Panam Infectol.* 2010; 12: 44-50.
- 82-Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.* 2009; 73(4): 338-344.
- 83-Ochoa A, López FM, Escalona G, Cruz A. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes . *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2013; 70(2): 138-150.
- 84-Organización Mundial de la Salud: Desinfectantes y antisépticos [Internet]. London: Royal Farmaceutical Society of Great Britain; 2014 [Citado 10 de junio del 2018] Disponible en:<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/19.html>.
- 85-Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ. In vitro study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(15): 4825-4834.
- 86-Supersafe D. Desinfectante de superficies - ROKER [Internet]. ROKER. 2017 [citado 08 Octubre 2017]. Disponible en:

<http://roker.com.pe/web/productos-roker-peru/roker-peruproductos-de-la-linea-horeca/supersafe-d-desinfectante-desuperficies>

- 87-MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
- 88-Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico. 12th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
- 89-Blázquez Garrido M. R, et al. Microbiological monitoring of medical devices after cleaning, disinfection and sterilisation. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.). 2018., 36: 10 p 657-661.
- 90-Díaz J A. Propuesta para la vigilancia de la salud de los trabajadores especialmente sensibles. MAPFRE Seguridad. 2005; 97:41-55.
- 91-Hernández E, Acosta M, Nadal B, Pijuan M, Abreu F, Armas N, et al. Intervención educativa para incrementar los conocimientos sobre bioseguridad en el personal de enfermería de una institución hospitalaria. Rev Cubana Enfermería 2006; 22(2):10-5.
- 92-Manuel R J , Kibbler C C. La epidemiología y prevención de la aspergilosis invasiva. J Hosp Infect. 1998; 39 (2): 95 – 109.
- 93-Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Biopelículas bacterianas en la naturaleza y en la enfermedad. Annu Rev Microbiol. 1987; 41 : 435–464.