



EVALUACIÓN DE TRES DESINFECTANTES FRENTE A 7 CEPAS DE *Salmonella* spp., PREVIAMENTE AISLADAS DE GRANJAS PORCICOLAS.

Ángela María Serna Valencia

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar por el título de
MICROBIOLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C.**



EVALUACIÓN DE TRES DESINFECTANTES FRENTE A 7 CEPAS DE *Salmonella spp.*, PREVIAMENTE AISLADAS DE GRANJAS PORCICOLAS.

Ángela María Serna Valencia

Concepción Judith Puerta Bula Ph.D
Decano Facultad de Ciencias

Marcela Franco Ph.D
Director del programa académico



EVALUACIÓN DE TRES DESINFECTANTES FRENTE A 7 CEPAS DE *Salmonella* spp., PREVIAMENTE AISLADAS DE GRANJAS PORCICOLAS

Ángela María Serna Valencia

APROBADO

Ana Karina Carrascal M. Sc.

Directora

Diana Corina Zambrano Ph.D

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946

La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a PorkColombia-FNP, por suministrar los insumos para esta investigación, así como a las personas que aislaron las cepas de Salmonella empleadas en esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA – JUSTIFICACIÓN	10
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1 Manejo de porcinos en granjas	11
3.2 Limpieza y desinfección en granjas porcinas	11
3.3 Desinfectantes	12
3.4 Mecanismo de acción de los desinfectantes	13
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Reactivación de cepas.	17
5.2 Preparación del banco de trabajo	17
5.3 Dilución correcta del desinfectante prueba	17
5.4 Método de prueba	17
5.5 Comparación de los recuentos de microorganismo	19
6. RESULTADOS/DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES / RECOMENDACIONES.	24
8. BIBLIOGRAFÍA	25
9. ANEXOS	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de agentes activos y su mecanismo de acción.	15
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología de la elaboración del banco de trabajo 1;Error! Marcador no definido.	
Figura 2. Metodología para la preparación del inóculo inicial de cada una de las cepas en estudio	18
Figura 3. Método dilución- neutralizante para la evaluación de los desinfectantes	19
Figura 4. Evaluación del desinfectante OX – VIRIN a una concentración de 0,5% frente a las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> spp.	20
Figura 5. Evaluación del desinfectante TH ₄ ⁺ a una concentración de 1% frente a las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> spp	21
Figura 6. Evaluación del desinfectante TH ₄ ⁺ a una concentración de 0.5% frente a las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> spp	22
Figura 7. Evaluación del desinfectante Huwa a una concentración de 0.5% frente a las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> spp. utilizando como neutralizante tiosulfato de sodio	23

RESUMEN

En las granjas porcinas es posible encontrar en ambientes, microorganismos persistentes, más cuando en esos ambientes se generan condiciones y hay animales susceptibles como lo son los porcinos. *Salmonella* spp., siendo patógeno no solo para los cerdos sino para el hombre donde es responsable de causar salmonelosis, se convierte en uno de los mayores problemas en salud pública; para tener un control de la presencia de este microorganismo en los ambientes de las granjas, es necesario realizar una implementación adecuada de un proceso de desinfección. Por eso el objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de tres desinfectantes sobre 7 cepas de *Salmonella* spp. aisladas previamente de distintas áreas de granjas porcícolas. Para llevar a cabo esto, se realizó el método dilución-neutralizante estipulado en la norma técnica NTC colombiana 5150 del 2003, fueron evaluados tres desinfectantes que son comúnmente utilizados en las granjas. Cada desinfectante fue evaluado a (30 segundos, 1 minuto y 5 minutos) a concentraciones del 1% y 0,5%. Determinando de esta manera la capacidad bacteriostática y bactericida de los desinfectantes, además del tiempo óptimo de exposición y la concentración en la cual se debe utilizar, obteniendo como resultado que el desinfectante OX-VIRIN puede ser utilizado con un tiempo de exposición de 1 minuto a una concentración del 0,5% y el TH4+ puede ser utilizado con un tiempo de exposición de 30 segundos a una concentración del 0,5%.

Palabras claves: *Salmonella* spp., granjas porcícolas, desinfectantes, amonios cuaternarios, iones de plata, bactericida.

EVALUACIÓN DE TRES DESINFECTANTES FRENTE A 7 CEPAS DE *Salmonella* spp., PREVIAMENTE AISLADAS DE GRANJAS PORCICOLAS.

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es un problema de salud pública, siendo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Enteritidis responsables de la mayoría de estos casos; este tipo de infecciones pueden atribuirse al consumo de productos avícolas y carnes de animales de corral entre estos los porcinos. (Jang, Y et al, 2017) Una vez los cerdos han estado en contacto con *Salmonella* spp. podrían adquirir el microorganismo y expulsarlo por las heces, ocasionando la contaminación de la carne durante el proceso de beneficio. Por esto es indispensable la elaboración de un programa para el control del microorganismo desde las granjas, que incluya un proceso de desinfección basado en la rotación de desinfectantes, permitiendo la correcta ejecución del programa de bioseguridad diseñado por la industria porcina.

Para la realización de un proceso de limpieza y desinfección, es indispensable el uso correcto del desinfectante, teniendo en cuenta su aplicación ya sea para ambientes o superficies. Es importante tener en cuenta factores fundamentales como: la carga orgánica del ambiente, la temperatura, el tiempo de exposición y concentración del desinfectante; estos factores permiten evaluarlos como agentes bactericidas y además permiten validar la metodología empleada. De esta manera, los procedimientos con el uso adecuado de desinfectantes contribuyen a reducir la incidencia de animales enfermos además de la transmisión de la enfermedad.

Todo lo anterior debe tenerse en cuenta debido a que *Salmonella* spp. genera grandes pérdidas en la industria porcícola al comprometer la salud del animal por la pérdida de peso, lo cual deriva en deficiencias en la calidad de la carne. En ocasiones el microorganismo puede generar la muerte de los cerdos en granja o los que son asintomáticos pueden seguir siendo fuente de contaminación afectando la población sana (Schwertz, 1990).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA – JUSTIFICACIÓN.

Salmonella spp. es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, de total importancia en emergencias de salud pública a nivel global. Es una bacteria resistente, que puede sobrevivir durante varias semanas en ambientes secos y varios meses en agua. Tienen como principal reservorio animales de sangre caliente como porcinos, ovinos, caprinos, aves de corral y algunos reptiles. Algunas especies pueden ser patógenas, causando enfermedades transmitidas por alimentos como la salmonelosis; algunos serotipos en particular, al colonizar a las personas pueden ser invasivos y llegar a ser mortales (OMS, 2018). Por lo general, esta patología se presenta en humanos y algunos animales como cerdos, ganado vacuno, ovejas, caballos, aves y roedores. (Zabaleta G, 2014) La transmisión en humanos se presenta a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal, también puede haber casos en los que las personas entran en contacto con animales infectados y que por lo general no presentan signos de enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2018).

En humanos el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos ha redundado en infecciones más duraderas y con mayor riesgo de hospitalización debido a la capacidad de *Salmonella* spp. de adquirir resistencia a determinados antimicrobianos, esto dado por la captación de nuevo material genético, mutaciones en el cromosoma bacteriano o al estrés ambiental (Bermúdez PM et al. 2014). Es por lo anterior, que una implementación adecuada en los procesos de limpieza y desinfección en granjas permite contar con porcinos no portadores de *Salmonella* spp. Y de esta manera se evitaría diseminar el microorganismo. Así habría menores pérdidas económicas y problemas de salud pública porque se estaría evitando deshacerse de animales enfermos y causantes de ETA.

Una manera de controlar la diseminación de *Salmonella* spp. en granjas porcícolas es el uso de programas de limpieza y desinfección. Para elegir el protocolo adecuado de desinfección es posible realizar una evaluación de la concentración adecuada y el tiempo de exposición que se debe emplear para los diferentes desinfectantes a utilizar. De esta manera no solo se lograría evitar persistencia del microorganismo durante la estadía en la granja y durante cualquier proceso, sino también evitar alguna tolerancia que puedan adquirir frente a los posibles desinfectantes a emplear. Debido a lo anterior es importante determinar la capacidad bactericida de los desinfectantes, donde se determine la concentración y el tiempo óptimo de exposición. Por todo lo anterior, el objetivo de este proyecto es determinar la eficacia de tres desinfectantes sobre 7 cepas de *Salmonella* spp., aisladas previamente de distintas áreas de granjas porcícolas.

3. MARCO TEÓRICO.

Salmonella spp. es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativa, la cual afecta al hombre accidentalmente. Se presenta principalmente en animales de alto consumo como lo es el cerdo y el pollo, donde sus productos son reconocidos como una importante fuente de infección para humanos (Arcos E et al. 2013). En superficies puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo, en condiciones de refrigeración. Algunos alimentos como la carne pueden contaminarse con *Salmonella* spp, asimismo se caracteriza por sobrevivir en ambientes secos. (Lake et al. 2002).

En Colombia, diversos estudios han demostrado la prevalencia *Salmonella* spp. en granjas porcinas, así como los factores de riesgo asociados a la presencia de la bacteria. Un estudio realizado por (Arcos et al. 2013) demostró una prevalencia de *Salmonella* spp. del 4.9% en carne de cerdo, un hallazgo importante en el estudio fue que los animales infectados con la bacteria no presentaban signos clínicos antes de su entrada a la planta, al igual que la ausencia de la bacteria en los porcinos post-mortem. En el Valle del Cauca, eje cafetero y Antioquia, se observó que la prevalencia general de *Salmonella* spp, fue de 5,82% (70/1202), en las plantas de beneficio equivale a un 6.17% (36/583), plantas de desposte a 4,83% (13/269) y para puntos de venta un 6% (21/350). Zapata et al. 2012, realizó un reporte en una planta de beneficio de Antioquia obteniendo una prevalencia de cero. En el sur del país, específicamente en Nariño se observó la prevalencia de esta bacteria en diversos establecimientos y vehículos contenedores de carne porcina, donde el 7% de las superficies en contacto con productos cárnicos se detectó presencia de *Salmonella* spp. en el 9,1% de las superficies inertes de los establecimientos, en el 5,9% de las superficies inertes de los vehículos de los transportadores de cárnicos y en el 3% de las superficies vivas o en las manos de los manipuladores (Guerra et al. 2011).

Es importante tener en cuenta, que el principal foco de diseminación de la bacteria se presenta por el uso incorrecto de desinfectantes en los establos, paredes y pisos, tuberías, canales y otros lugares dentro de la granja donde son almacenados y tratados los cerdos. (Corrales et al. 2008)

3.1 Manejo de porcinos en granjas

Todo predio debe estar inscrito ante el ICA, donde el responsable del predio debe informar al ICA todos los ingresos y salidas de los animales. El ingreso de animales se debe reportar en un plazo no mayor a 30 días.

- Instalaciones y áreas

Los predios/ granjas, se deben ubicar de acuerdo con el plan de ordenamiento territorial POT de cada municipio. Deben estar alejados de fuentes de contaminación como basureros y rellenos sanitarios, estar claramente delimitados y que las cercas estén en buen estado.

Las instalaciones no solo deben permitir a los operarios realizar con comodidad y seguridad los procedimientos de manejo, sino que también deben ser instalaciones que brinden bienestar a los animales. Las fincas/ granjas deben contar con potreros o corrales de aislamiento para los animales que requieren tratamiento veterinario y manejo especial. Al igual que, tener pasillos o senderos para traslado de porcinos dentro del mismo sitio de reproducción.

Identificar las diferentes áreas según el sistema de producción. Las áreas de alojamiento deben brindar el espacio requerido de acuerdo con la etapa productiva.

Los pisos deben ser construidos en material antideslizante.

3.2 Limpieza y desinfección en granjas porcinas.

La normas de bioseguridad y la puesta en marcha de planes sanitarios deben estar de conformidad con la ley establecida en la Resolución 2640 del 28 de Septiembre del 2007 del Instituto Colombiano Agropecuario ICA que establece " por la cual se

reglamentan las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado porcino destinado al sacrificio para consumo humano" la cual tiene por objeto establecer los requisitos sanitarios que deben cumplir los predios/granjas de producción primaria dedicados a la producción de bovinos y bufalinos/porcinos destinados para el consumo humano, con el fin de proteger la vida, la salud humana y el ambiente.

Actualmente existe la norma NTC 5150 del ICONTEC específicamente desarrollada para calificar la actividad bactericida de desinfectantes utilizados en plantas de alimentos y que describe un método en suspensión para determinar esta capacidad en laboratorios, según la disminución en la concentración celular de los microorganismos utilizados, luego de realizada la prueba (Herrera A, 2011). También se tendrá en cuenta la Guía de Buenas Prácticas para el subsector Porcícola de la Asociación Colombiana de Porcicultores (Porkcolombia, 2015), con el propósito de realizar:

- La gestión de riesgos sanitarios, biológicos y químicos en la producción primaria.
- Comunicación del riesgo.
- Garantía de inocuidad en la producción primaria.
- Protección de animales.
- Protección del consumidor.
- Competitividad.

Los productores porcinos saben desde hace mucho tiempo que las explotaciones se pueden convertir en “edificios enfermos”, lo que a largo plazo produce una disminución constante en la salud y el rendimiento. Por lo tanto, es necesario mantener unos niveles elevados de higiene de las instalaciones si se quieren evitar enfermedades y conseguir un rendimiento óptimo.

A groso modo, por orden de importancia los agentes infecciosos se pueden encontrar y transmitir a través de:

- Cerdos vivos.
- Heces, orina y secreciones recientes de los cerdos.
- Cadáveres de cerdos.
- Estiércol.
- Alimañas – en particular, ratones, pero también ratas.
- Pájaros.
- Insectos.
- La transmisión mecánica de la enfermedad a través de gatos, perros y personas también es posible.

Los objetivos de vaciar, limpiar y desinfectar las construcciones de la granja son:

- Eliminar patógenos, polvo y endotoxinas del entorno.
- Eliminar los ciclos de infección a través de las rutas cerdo-a-cerdo, portador-a-portador y portador-a-cerdo.
- Eliminar la transmisión a los siguientes lotes de cerdos de agentes infecciosos procedentes de la contaminación de los edificios y el equipo con heces, orina, secreciones y estiércol infectados.
- Eliminar la supervivencia de agentes infecciosos en nichos biológicos tales como el suministro de agua, tolvas de alimentación, etc.
- Aprovechar la oportunidad para reparar, mejorar o sustituir el equipo defectuoso o deteriorado. (Instituto colombiano agricultura, 2017).

Los procedimientos de desinfección pueden ser continuos o terminales. La desinfección continua es necesaria, su objetivo es minimizar la transmisión de infecciones dentro de la población porcina. La desinfección terminal es preferible a la desinfección continua, pero sólo se puede lograr en edificios o lugares que hayan sido vaciados totalmente de cerdos.

3.3 Desinfectantes

Dentro de cada área de producción y en base a la patología presente dentro de la granja junto con la epidemiología regional, se debe definir el desinfectante más apropiado considerando que el coste de la desinfección es mínimo y el retorno del beneficio muy elevado. Por lo que se debe dedicar especial atención a la buena elección del desinfectante.

Se considera importante el cambio constante de desinfectantes conociendo el tiempo de exposición y la concentración adecuada de estos, teniendo en cuenta para que aplicaciones serán utilizados. Lo anterior evitaría posibles resistencias por parte del microorganismo a los desinfectantes. Las dosis de aplicación deben ajustarse a las recomendaciones de los fabricantes, sino no se estaría empleando correctamente el producto y por el contrario se podrían obtener incluso efectos negativos. Debemos prestar especial atención a la calidad del agua de lavado y a su uso racional. (Guía técnico comercial mylva, 2017)

Cuando se habla de desinfectantes se pueden mencionar diferentes tipos, los cuales se caracterizan cada uno por tener un principio activo. Algunos de estos podrían ser:

- Desinfectantes clorados con un principio activo como el hipoclorito de sodio.
- Glutaraldehídos.
- Sales de amonio cuaternario las cuales son producidas de la reacción entre aminas terciarias con haluros de alquilo.
- Alcoholes como el etanol o isopropanol.
- Peróxido de hidrógeno.
- Ácido peracético el cual es un oxidante compuesto por ácido acético y peróxido de hidrógeno en solución acuosa.
- Biguanidas poliméricas (PHMB), las biguanidas como principio activo.
- Aminas terciarias.
- Ácidos y álcalis con un principio activo como el ácido láctico. (Malheiro et al, 2016)

3.4 Mecanismo de acción de los desinfectantes

Muchas sustancias químicas son capaces de inhibir o eliminar los microorganismos y a pesar de que haya diferentes principios activos con características bactericidas, no existe un producto capaz de convertirse en el agente ideal para el control microbiológico, pero si podría llegar a cumplir características que lo cataloguen como un desinfectante con buen desempeño. Las características de un desinfectante ideal son:

- Debe ser soluble en agua.
- Amplio espectro de actividad.
- Estable.
- No toxico.
- Acción rápida.
- Capacidad de penetración.
- No afecte el medio ambiente.
- Disponibilidad y buena relación costo-riesgo-beneficio.
- Acción residual.
- No debe inactivarse con la presencia de materia orgánica y tampoco reaccionar.

Por otro lado, cada desinfectante presenta mecanismos de acción complejos y diferentes sobre los agentes infecciosos. Las acciones se ejercen sobre una función comprometiéndose luego otra, algunas veces reversible y otras irreversibles (Rodríguez et al., 2004). Dentro de los principales mecanismos de acción de los desinfectantes se encuentran:

1. Daño en la pared celular.
2. Alteración en la permeabilidad de la membrana citoplasmática.

3. Alteración de la naturaleza coloidal del citoplasma.
4. Formación de antimetabolitos.
5. Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos.
6. Inhibición de la acción enzimática.

Tabla 1. Ejemplos de agentes activos y su mecanismo de acción

ACCIÓN	Grupo químico
Pared celular. Membrana celular.	<ul style="list-style-type: none"> • Aldehídos. • Tensoactivos aniónicos. • Fenoles y derivados. • Biguanidas.
Material nuclear.	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido de etileno. • Colorantes. • Agentes alquilantes.
Enzimas. Proteínas.	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes oxidantes. • Halógenos. • Alcoholes. • Ácidos y álcalis. • Metales pesados.

(Rodríguez et al., 2004)

En este proyecto fueron utilizados para la realización de la prueba tres desinfectantes catalogados como virucidas, bactericidas y fungicidas, cada uno con diferente principio activo para poder observar la acción que ejercen estos ante las cepas de *Salmonella* sp. seleccionadas. Uno de ellos fue el desinfectante TH4, el cual es una mezcla de glutaraldehído y 4 compuestos de amonio cuaternario como lo son el *didecyldimetil amonio cloruro*, el *dioctyldimetil amonio cloruro*, el *octydecildimetil amonio cloruro* y el *alkyl dimetil benzil amonio cloruro* con una eficacia comprobada sobre patógenos causantes de enfermedades en animales. Este se recomienda su aplicación por pulverización, aspersion o inmersión después de ser diluido en agua en una dosis de 0,5% a 2%, sin embargo, para bacterias y hongos se recomienda dosis del 0,5 %. Esta dosificación puede aumentar en circunstancias especiales y se debe evitar el contacto directo con los animales. (Soydelcampo ®, 2013)

Otro de los desinfectantes utilizados fue el denominado OX-VIRIN el cual aparte de tener actividad bactericida es un producto 100% biodegradable que tiene entre sus componentes peróxido de hidrógeno, ácido acético, ácido peracético y nucleó OX-VI el cual es una sustancia tensoactiva que favorece la creación de una capa perfecta que permite la adherencia y penetración en superficies difíciles. Se recomienda su uso para la desinfección en condiciones extremas o con riesgo de contaminación por microorganismos patógenos altamente resistentes. Como es un producto concentrado requiere dilución en agua antes de su uso, con una concentración del 0,25% al 5% según para lo cual sea requerido.

Teniendo en cuenta que se requiere para la limpieza y desinfección del circuito hídrico como tuberías y bebederos en ausencia de animales, para la desinfección completa de ambientes, superficies y estructuras que tienen contacto directo con los porcinos como lo son salas de parto y destetes, también para la desinfección de pediluvios, arcos, camiones del ganado; se recomienda una concentración del producto del 0,5% y 1%. (OXCTA, 2012)

Por último, el otro tipo de desinfectante evaluado HUWA SAN dice tener un alto espectro de acción incluso a concentraciones pequeñas, siendo la alternativa a productos halogenados y a los productos que cuenten en su composición con aldehídos y amonios cuaternarios como lo es el desinfectante TH4⁺. Útil para la desinfección de establos, superficies, instrumental y sistemas de agua,

reduciendo de esta manera el contagio de los porcinos y de otros animales por parte de microorganismos como *Salmonella* spp. (Sercopag, 2014).

Es un producto estable compatible con el medio ambiente, compuesto con una disolución de peróxido de hidrógeno y plata coloidal-iónica. A pesar de tener claro la importancia de la dilución a la cual se debe emplear, no se establece la concentración del producto en la ficha.

Antes de empezar la evaluación de los desinfectantes y de saber si es posible realizarse mediante el método dilución-neutralizante, es importante establecer el neutralizante correcto. Los neutralizantes tienen como principal función inactivar el desinfectante, de esto dependerá su eficacia. Dentro de los más utilizados para esta actividad se encuentra el caldo Lethen, el cual es efectivo para la recuperación de bacterias que se encuentran expuestas a desinfectantes que tienen en su composición amonios cuaternarios. Sin embargo, cuando hablamos de desinfectantes que tienen dentro de sus componentes iones de plata, se genera el problema de tener que evaluar el neutralizante correcto debido a que se pueden obtener un falso negativo para este neutralizante (no crecimiento), obteniéndose de esta manera resultados poco confiables. Según algunos artículos técnicos para estos desinfectantes se recomienda el uso de una solución neutralizante de tiosulfato de sodio. (Álvarez G, Martínez M and Silva M, 2001)

Por último, con respecto al neutralizante también se debe tener en cuenta que existen factores que afectan la neutralización de los desinfectantes y los agentes antimicrobianos. Por eso se debe tener en cuenta que el neutralizante elegido se capaz de inhibir la acción del desinfectante, no debe ser tóxico para los microorganismos del ensayo, no puede formar algún compuesto tóxico junto con el desinfectante y debe ser utilizado bajo las mismas condiciones normales en las cuales es utilizado el desinfectante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar la eficacia de tres desinfectantes sobre 7 cepas de *Salmonella* spp. aisladas previamente de distintas áreas de granjas porcinas.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el tiempo de exposición óptimo de los tres desinfectantes sobre las 7 cepas diferentes de *Salmonella* spp. aisladas de distintas áreas de granjas porcinas.
- Determinar la concentración óptima de los tres desinfectantes sobre las 7 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de distintas áreas de granjas porcinas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivación de cepas.

Fueron seleccionadas 7 cepas de *Salmonella* spp. (24, 237, 240, 432, 307, 333, 381) que previamente se aislaron de granjas porcícolas, las muestras de donde se aislaron fueron botas de trabajadores y ambientes como salas de parto, circuitos hídricos, bebederos y corrales vacíos. Para el proyecto fueron reactivadas en caldo BHI (Brain Heart Infusión) y se les realizó prueba de pureza mediante tinción de Gram. (Madigan et al., 2017)

5.2 Preparación del banco de trabajo

Con las 7 cepas seleccionadas se realizó el banco de trabajo. Se utilizó un método de conservación a temperatura congelación donde para cada cepa se utilizó 2ml de glicerol con 10ml de caldo BHI y fueron divididos en 10 viales. (Perry, 1998). De esta manera fue posible realizar múltiples repeticiones del mismo método con la misma cepa. La realización del banco de trabajo se hace con la finalidad de disminuir el riesgo de contaminación durante el proyecto.

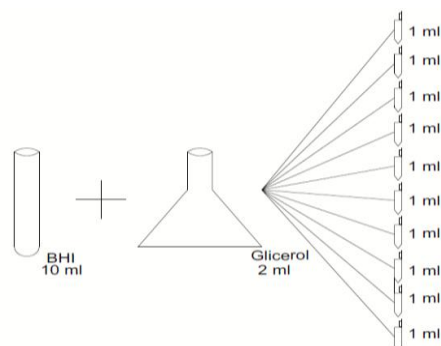


Figura 1. Metodología de la elaboración del banco de trabajo.

5.3 Dilución correcta del desinfectante prueba

El producto prueba concentrado, requirió de una dilución antes de su uso y la concentración dependió de la aplicación para la cual se requiere. Teniendo en cuenta que el desinfectante es utilizado en ambientes, se realizaron pruebas de los desinfectantes tanto al 1% como al 0,5% y así se determinó la concentración correcta a evaluar. Se debe tener en cuenta que la concentración dependió de lo establecido por cada desinfectante en sus condiciones de uso para la aplicación que se requiere.

5.4 Método de prueba

De acuerdo con el objetivo planteado de determinar si los 3 productos (A, B y C) cumplían con los requisitos de prueba para considerarlos como poseedores de actividad bactericida, se requirió la realización de un método validado como lo es el método dilución – neutralizante (Marín J et al. 2008).

El método consta de la realización de diluciones seriadas en base diez de la suspensión celular con una absorbancia entre 0,170 y 0,240 a 610 nm. Además, se debe de tener la utilización de un neutralizante previamente validado para el desinfectante que va a someterse a la prueba. Por otro lado, este neutralizante debe ser estéril, capaz de funcionar como agente emulsificante y neutralizador de compuestos de amonio cuaternario y iones de plata. El método dilución-neutralizante se lleva a cabo con agua

peptonada para las diluciones seriadas y como neutralizantes fueron utilizados caldo Letheen (Britania, 2015) y un medio por componentes el cual contenía peptona al 1%, NaCl al 0,5%, tiosulfato 6g/L y fosfato de sodio 3,5g/L.

El agua utilizada para el método fue la del grifo, es decir, la del agua potable de la universidad. Los tiempos de exposición elegidos para este proyecto, los cuales se tuvieron en cuenta de manera cronometrada en cada una de las repeticiones y con todas las cepas son de 30 segundos, 1 minuto y 5 minutos.

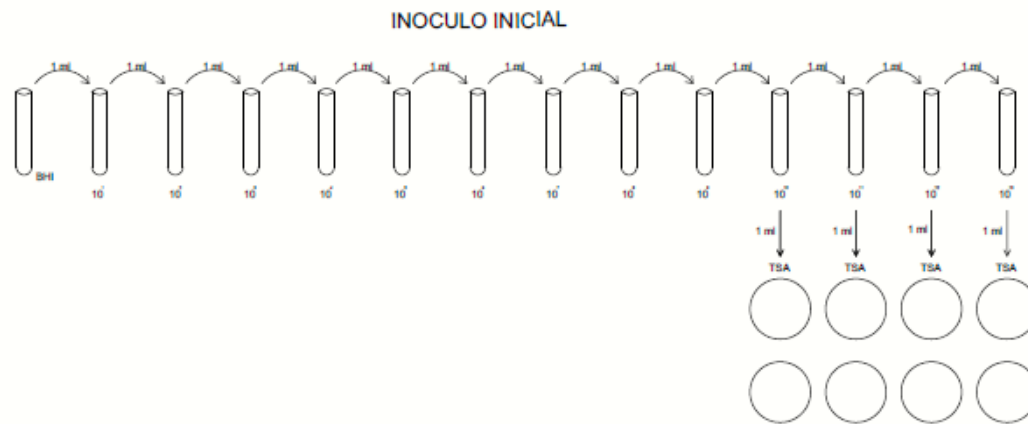


Figura 2. Metodología para la preparación del inóculo inicial de cada una de las cepas en estudio.

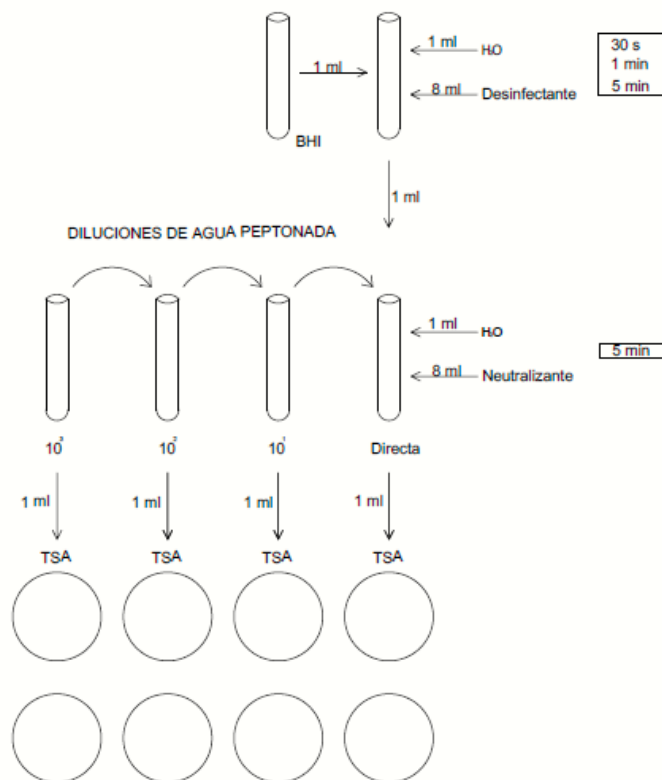


Figura 3. Método dilución- neutralizante para la evaluación de los desinfectantes.

5.5 Comparación de los recuentos de microorganismo

Para los recuentos de *Salmonella* spp. se realizó siembra en profundidad de las 4 últimas diluciones (10^{10} - 10^{13}) en Tripteína Soya Agar, esto para el inóculo inicial. Además de cada uno de los tiempos evaluados por cada desinfectante también fue realizada la siembra en profundidad de las 4 últimas diluciones (directo- 10^3) en Tripteína Soya Agar. Esto se hizo con la intención de determinar la actividad del desinfectante mediante una comparación observando si había una disminución de 5 unidades logarítmicas.

6. RESULTADOS/DISCUSIÓN

Para el análisis de los resultados, se estableció como efectivo el desinfectante cuando se redujeron 5UL (99.999%) comparado con el control (inoculo inicial) el cual no fue tratado con ningún desinfectante.

Con respecto al primer desinfectante evaluado (OX-VIRIN) cuyo principio activo son diferentes ácidos (peracético, acético) y peróxido de hidrógeno, en su ficha técnica se establece que su actividad bactericida se genera a partir de una concentración del 1%. Al realizar el método dilución- neutralizante establecido en la NTC 5150 se evidenció que el producto si cumplía con lo establecido en su ficha técnica, inhibiendo en su totalidad el crecimiento de las 7 cepas en estudio (datos no mostrados); a partir de este resultado se tomó la decisión de disminuir la concentración del desinfectante al 0.5%, poniéndose en contacto cada una de las cepas de *Salmonella* spp. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 4.

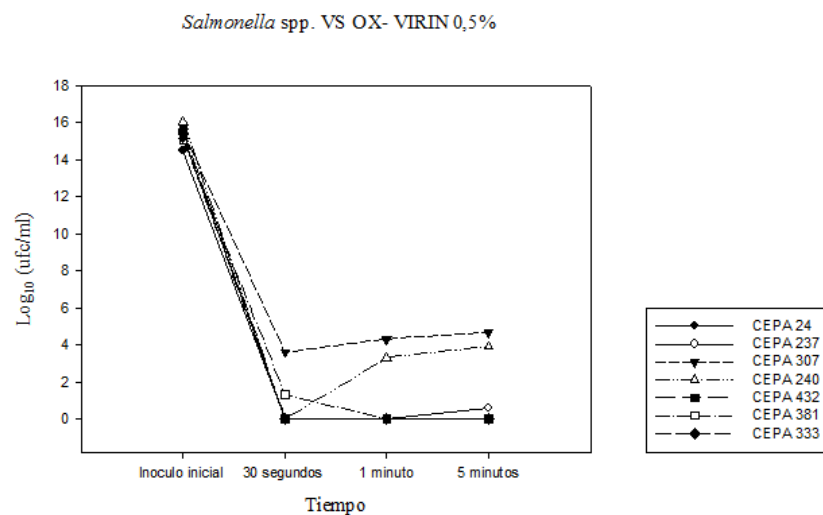


Figura 4. Evaluación del desinfectante OX – VIRIN a una concentración de 0,5% frente a las diferentes cepas de *Salmonella* spp.

En este caso, puede observarse que para todas las cepas evaluadas hubo una disminución de más de 10 UL a los 30 segundos de exposición, debido a los mecanismos de acción que ejerce el desinfectante sobre las cepas. Pasado 1 minuto de exposición del desinfectante, las cepas 240 y 307 aumentaron alrededor de 3 UL. Teniendo en cuenta que el ácido acético y peracético presente en este desinfectante inhiben la síntesis de proteínas y realizan una inactivación de enzimas intracelulares involucradas en el metabolismo bacteriano y que en la medida que se usa se va consumiendo lo que podría explicar este resultado.

La tolerancia de las cepas anteriormente mencionadas puede deberse a los diferentes mecanismos empleados por ciertas especies de *Salmonella* spp. para proteger la integridad de la célula. Se ha reportado que al pertenecer al grupo de bacterias Gram negativas tienen la particularidad de generar impermeabilidad en su pared celular siendo menos susceptibles a los biocidas (Sheldon Jr, 2005). En otro estudio donde evalúan la protección de los patógenos contra la acción de desinfectantes, exponen algunos de los mecanismos implicados los cuales incluyen la señalización entre especies, interferencia entre moléculas de biocidas y moléculas presentes en la matriz, cambios en su fisiología y plasticidad genética (Sanchez 2015).

Con relación a los resultados del desinfectante TH4⁺ en la concentración de 1%, se observa una disminución considerable pero después de 1 minuto de exposición (Figura 5). No obstante, la cepa 333 y nuevamente la cepa 307 evidenciaron un aumento a los 5 minutos, lo que indica que los mecanismos de resistencia de la cepa 307 son altamente efectivos en comparación con otras cepas.

Si bien el principio activo del desinfectante TH4⁺ corresponde a la presencia de amonios cuaternarios cuya actividad bactericida consiste en la inhibición de las actividades de transporte de nutrientes de la membrana celular, las cepas resistentes como se mencionó anteriormente tienen la capacidad de afectar la permeabilidad membranal impidiendo la efectividad de la actividad

desinfectante. (Merianos, J, 2001) Este mismo comportamiento se evidenció en la concentración de 0.5% en la que cuatro cepas (307, 240, 333 y 432) crecieron luego de 1 minuto de exposición (Figura 6). Este resultado indicó que la concentración del desinfectante incide sobre su eficiencia. Adicionalmente en comparación con el desinfectante (OXI-VIRIN) demostró una menor efectividad pues aún en la concentración de 1% se observó persistencia en el crecimiento de las cepas.

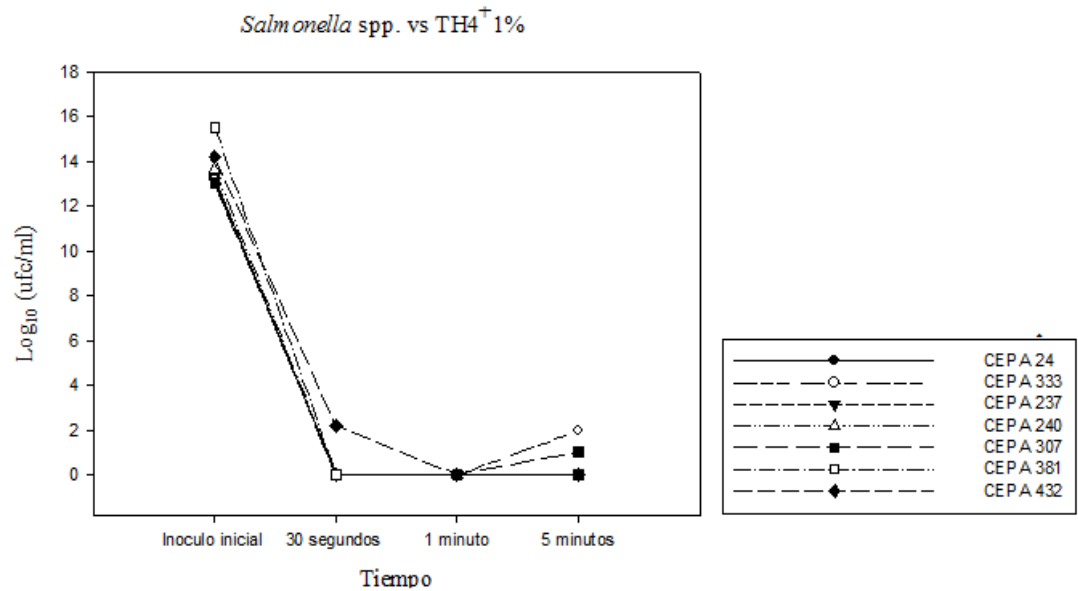


Figura 5. Evaluación del desinfectante TH4⁺ a una concentración de 1% frente a las diferentes cepas de Salmonella.

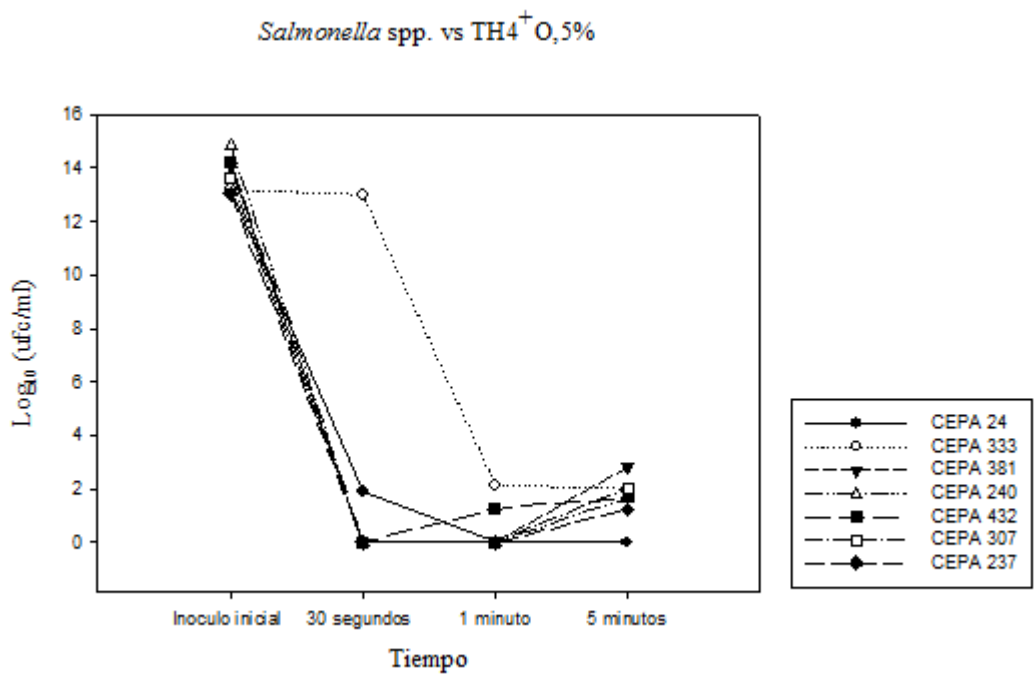


Figura 6. Evaluación del desinfectante TH4⁺ a una concentración de 0.5% frente a las diferentes cepas de Salmonella sp.

Al evaluar el desinfectante en prueba HUWA, el cual tiene entre sus componentes peróxido de hidrógeno e iones de plata como principios activos, se observó que el caldo Letheen utilizado como neutralizante no estaba funcionando correctamente, y por el contrario se estaban observando resultados falsos negativos. Por esto fue necesario cambiar el neutralizante y se decidió utilizar uno que tuviera como principal componente el tiosulfato de sodio, ya que en algunos estudios realizados consideran adecuados el uso de este para la neutralización de iones de plata (FDA, 2017).

A pesar de realizar este cambio, no fue posible obtener los resultados. Esto se comprobó después de varios ensayos. Pasados las 24 horas después de la siembra no se observaba crecimiento en las cajas sembradas del tubo (neutralizante-inoculo-desinfectante), como se puede ver en la figura 4(381) donde a los 5 minutos se observa una X azul de no crecimiento del microorganismo, pero en la caja posterior que corresponde a la siguiente dilución se observa una flecha rosada que corresponde a la presencia de crecimiento de la cepa. Lo mismo se puede observar en algunos tiempos en la figura 4 (432), (240) y (307). Por lo anterior al ver que el neutralizante no fue efectivo, el método quede invalidado, recientemente la FDA, ha desarrollado un nuevo neutralizante para este tipo de agentes por tanto sería necesario realizar este ensayo para poder determinar la eficacia de este agente químico.

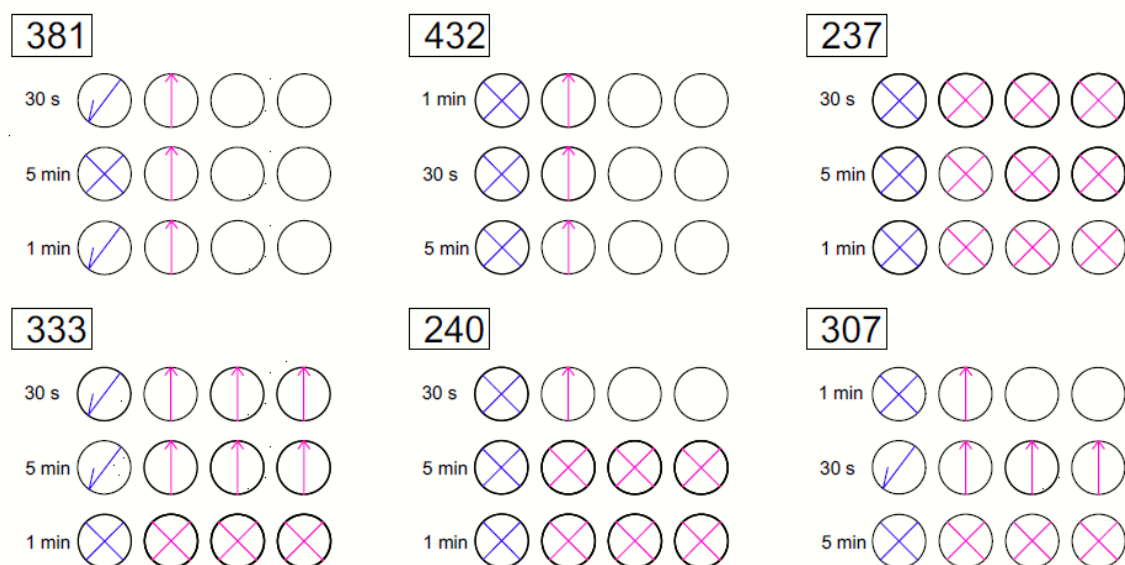


Figura 7. Evaluación del desinfectante Huwa a una concentración de 0.5% frente a las diferentes cepas de *Salmonella* spp. utilizando como neutralizante tiosulfato de sodio.

Lo anterior puede deberse a una falla en la elección del neutralizante, el cual previamente debió haber sido validado para que se ajustara al desinfectante elegido; por eso se recomienda la búsqueda de un mejor neutralizante que sea apto para iones de plata. Esta invalidez del método puede deberse a varios factores: primero puede ser que el neutralizante no fuera capaz de inhibir la acción del desinfectante, segundo el neutralizante pudo ser tóxico para el microorganismo en estudio, o seguramente, generara o formara algún compuesto entre el desinfectante y neutralizante causando toxicidad para las cepas. Lo anterior se relaciona con lo mencionado en el estudio realizado por Jung (2008) en el cual emplearon el desinfectante a base de iones de plata y el neutralizante tiosulfato de sodio, y no observaron la inactivación de la actividad del desinfectante. (Jung Kyung et al, 2008)

En dicho estudio evaluaron la actividad antibacteriana y el mecanismo de acción de los iones de plata en *S. aureus* y *E. coli*, y mencionan que las proteínas y otros componentes celulares juegan un papel esencial en la acción antimicrobiana de los iones de plata. Además, estos iones causan la liberación de iones de potasio por parte de las bacterias; por lo tanto, la membrana citoplasmática se desestabiliza; esta posee proteínas transmembranales importantes que se convierte en un blanco para el ataque bactericida de los iones de plata. (Jung Kyung et al, 2008)

Los resultados obtenidos los podemos comparar con el estudio realizado por Mac Laren y col, donde evaluaron diferentes desinfectantes con los mismos principios activos utilizados en el presente estudio y en los mismos ambientes con presencia de *Salmonella* spp. en granjas; a pesar de que no utilizaron la misma metodología los desinfectantes fueron probados a las mismas concentraciones, 0,5% y 1%. Los desinfectantes con compuestos cuaternarios resultaron efectivos al igual que los desinfectantes con glutaraldehído, eso si dependiente en el ambiente en el que era empleado y lo mismo sucedió con los desinfectantes a base de peróxidos y ácidos (Ian McLaren et al, 2011).

Teniendo en cuenta que para el tercer desinfectante evaluado no se pudieron obtener resultados confiables, no se podría comparar con los resultados obtenidos con el uso de los otros desinfectantes. Por esta razón según los resultados evidenciados en las figuras de los recuentos de los desinfectante OX-VIRIN y TH4+ se podría indicar que el mejor desinfectante para la disminución del crecimiento de las cepas de *Salmonella* spp. empleadas fue TH4 al 1%, porque solo dos cepas transcurridos los cinco minutos presentaron un leve aumento en las unidades logarítmicas. Lo anterior pudo deberse a los principios activos que componen a estos dos desinfectantes, siendo más efectivo la combinación glutaraldehído y los 4 amonios cuaternarios.

Finalmente, los resultados obtenidos nos indican que los dos primeros desinfectantes evaluados durante el presente estudio resultan efectivos para ser utilizados en granjas porcícolas y se podría generar una inactivación de las cepas siempre y cuando sean utilizados de manera adecuada.

7. CONCLUSIONES / RECOMENDACIONES.

Se determinó que el desinfectante TH4+ fue el más efectivo en un tiempo de exposición de 30 segundos a una concentración del 0,5%; sin embargo, el OX-VIRIN también fue efectivo generando una inactivación de las cepas evaluadas en un tiempo de 1 minuto a una concentración del 0,5%.

No fue posible obtener la concentración, ni el tiempo de exposición óptimo del desinfectante Huwa, esto debido a no incluir un correcto neutralizante para su evaluación. Por esto se recomienda que previo a la valoración y a la elaboración del método dilución neutralizante, se realice una estandarización y estudio de los posibles neutralizantes según las características de composición del biocida.

Los dos primeros desinfectantes evidenciaron una actividad bactericida sin embargo a los 5 minutos de exposición algunas de las cepas utilizadas de la evaluación mostraron una activación, lo que significa que después de este tiempo el desinfectante puede tener una actividad bacteriostática.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Arcos E, Mora L, Fandiño de Rubio L, Rondón I. (2013). Prevalencia de Salmonella spp. en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. *Orinoquia*, 17(1).
2. Bermúdez PM, Rincón SM, Suárez MC. (2014). Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Salmonella spp. aisladas del beneficio porcino en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*; 32(1): 88-94
3. Corrales L , Angel V, Caicedo D. (2016). Identificación de Salmonella y Escherichia coli en manos y guantes de manipuladores en planta de sacrificio y faenado de un municipio de Cundinamarca.
4. FDA (U.S.Food and Drug Administration). (2017). Estados Unidos. U.S. *Department of Health and Human Services*. Recuperado de: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064244.htm>
5. Guerra A , Trejo S , Caranguay M , Paz M, Ibarra M , Trujillo E, Hidalgo C, Rocha A. Prevalencia de Salmonella ssp. (no tifoideas) en el Departamento de Nariño, *Colombia. Univ. Méd.* ISSN 0041-9095. Bogotá (Colombia), 55 (4): 365-373, octubre-diciembre, 2011.
6. Guía técnico comercial mylva. (2017). Guía Mylva 2017. [online] Available at: http://www.mylva.eu/docs/mylva_guia_tecnico_comercial_2017sp.pdf
7. Herrera A. (2011). Evaluación de la eficacia de 3 desinfectantes, frente a cepas de Listeria monocytogenes aisladas de industria cárnica colombiana (Bachelor's thesis).
8. Instituto colombiano agricultura. (2017). Reglamentación sobre las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino y porcino. [online] Available a <http://www.ica.gov.co/getdoc/016f3c96-a458-4fa6-ae96-41d18b2221f5/Requisitos-Sanitarios-y-de-Inocuidad-en-la-Producc.aspx> [Accessed 15 Jan. 2018].
9. Jang, Y., Lee, K., Yun, S., Lee, M., Song, J., Chang, B., & Choe, N. H. (2017). Efficacy evaluation of commercial disinfectants by using Salmonella enterica serovar Typhimurium as a test organism. *Journal of veterinary science*, 18(2), 209-216.
10. Jung Kyung Woo, Cheong Koo Hye, Woo Kim Ki, Shin Sook, Hyun Kim So y Ho ParkYong, (2008). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 74(7), 2171–2178.
11. Laboratorios Britania (2015), Letheen Caldo. Argentina: *Britania Lab*. Recuperado de:http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a282cc0dde66.pdf.
12. Lake R, Hudson A, Cressey P (2002) Risk profile: Salmonella (non typhoid) in poultry (Whole and Pieces). *Institute of Environmental Science & Research Limited*, pp 63.
13. Madigan M, Martinko J, & Parker J (2017). *Brock biology of microorganism* (Vol 13) Pearson.
14. Malheiro, J. Gomes, I. Borges, A. Bastos, M. Maillard, Y-J. Borges, F and Simões, M. Phytochemical profiling as a solution to palliate disinfectant limitations, *Biofouling*, 32, 9, (1007), (2016).
15. Marín Díaz, J. C., Navarro Peña, N. F., & Santos Arévalo, N. (2008). Evaluación del método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma técnica colombiana 5473 de 2007 (Bachelor's thesis).
16. McLaren, I., Wales, A., Breslin, M., & Davies, R. (2011). Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination. *Avian pathology*, 40(1), 33-42.
17. Merianos, J, 2001. Surface, active agents. En: Block, S. S. (ed.), *Disinfection, sterilization, and prevention*. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A., USA
18. Mora, A. (2003). Evaluación de la prevalencia de Salmonella spp en jugos cárnicos de porcinos sacrificados en las plantas de beneficio de Bogotá DC (Tesis Pregrado). Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
19. Organización Mundial de la Salud. (2018). Salmonella (no tifoidea). [online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/> [Accessed 8 Jan. 2018].
20. OXCTA (2012). Eficacia OX-VIRIN. Huesca, España. Recuperado de: grupoox.com/eficaciavirin.php
21. Perry S (1998) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular biotechnology*, 9: 59-64
22. Rajic´A, McFall ME, Deckert AE, Reid-Smith R, Manninen K, Poppe C, et al. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from finishing swine and the environment of 60 Alberta swine farms. *Vet Microbiol.* 2004; 104: 189–196.

23. Rodríguez, M., Rodríguez, C., Mojica, B., Hidalgo, H., Caicedo, P. and Alonso, A. (2004). Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. 1st ed. [ebook] Bogotá DC. Available at: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIIH/007%20Desinfectantes.pdf> [Accessed 2 Oct. 2017].
24. Sanchez P, Orgaz B, Aymerich S, Le Coq D & Briandet R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectans in multisoecies biofilms. *Frontiers in microbiology*, 6: 705.
25. Schewartz K. Salmonellosis in Midwestern swine. *Proccedings of the 94th annual meeting US animal Health association*, 443-449, 1990.
26. Sercopag (2014). HUWASAN50 agrodesinfectante, fungicida y bactericida. *La tienda de sercopag*. Recuperado de: <http://www.tienda.sercopag.com/producto/huwa-san-50-agro/>
27. Sheldon Jr, A. T. (2005). Antiseptic “resistance”: real or perceived threat?. *Clinical infectious diseases*, 40(11), 1650-1656.
28. Soydelcampo (2013), Desinfectante TH4+. *Soy del campo*. Recuperado de: http://www.soydelcampo.com/vademecum_veterinario/productos.php?id=2382&prod=desinfectante-th4+
29. Zabaleta Espinosa, G. (2014). Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella spp., aisladas en la cadena cárnica porcina en tres regiones del país. pontificia universidad javeriana.
30. Zapata, J. F., Vergara, L. A., and Cuervo, C. M. (2014). Detección de bacterias del género Salmonella sp. en matadero de cerdos de un municipio de Antioquia. *Ciencias forenses y de la salud*, 8(8).

9. ANEXOS

ANEXO 1

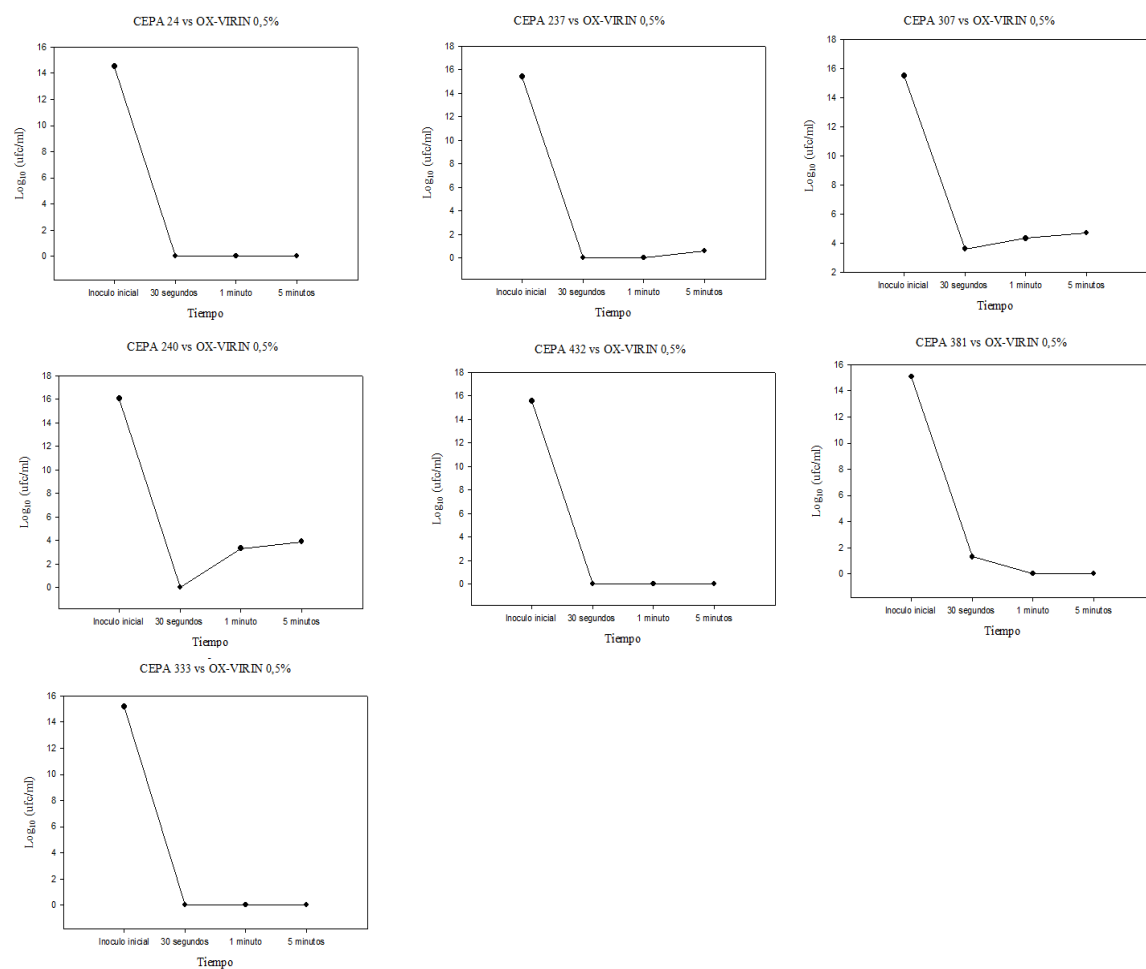


Figura 8. Evaluación del desinfectante OX – VIRIN a una concentración de 0,5% frente a cada una de las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas

ANEXO 2.

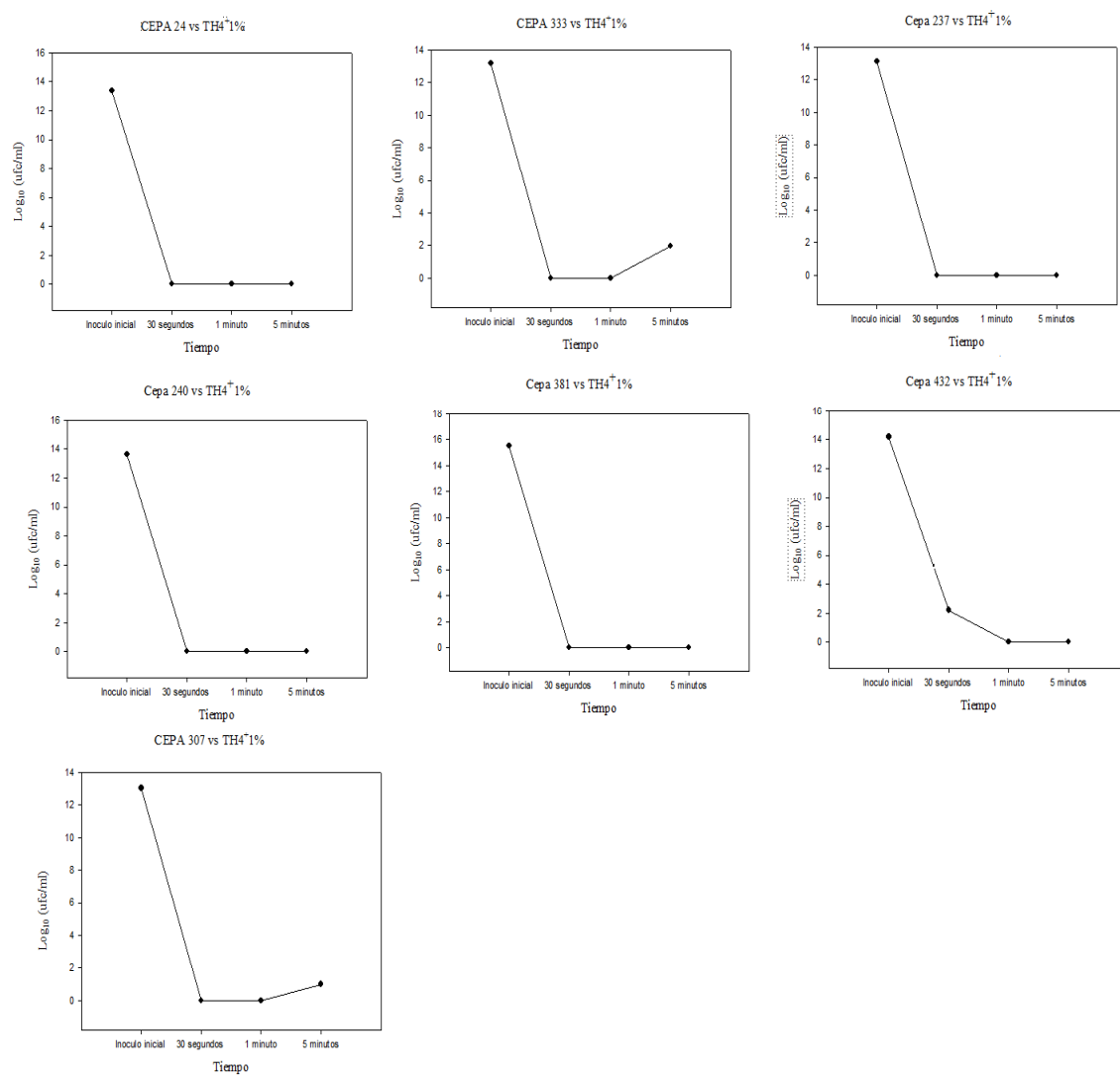


Figura 9. Evaluación del desinfectante TH4+ a una concentración del 1% frente a cada una de las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas.

ANEXO 3.

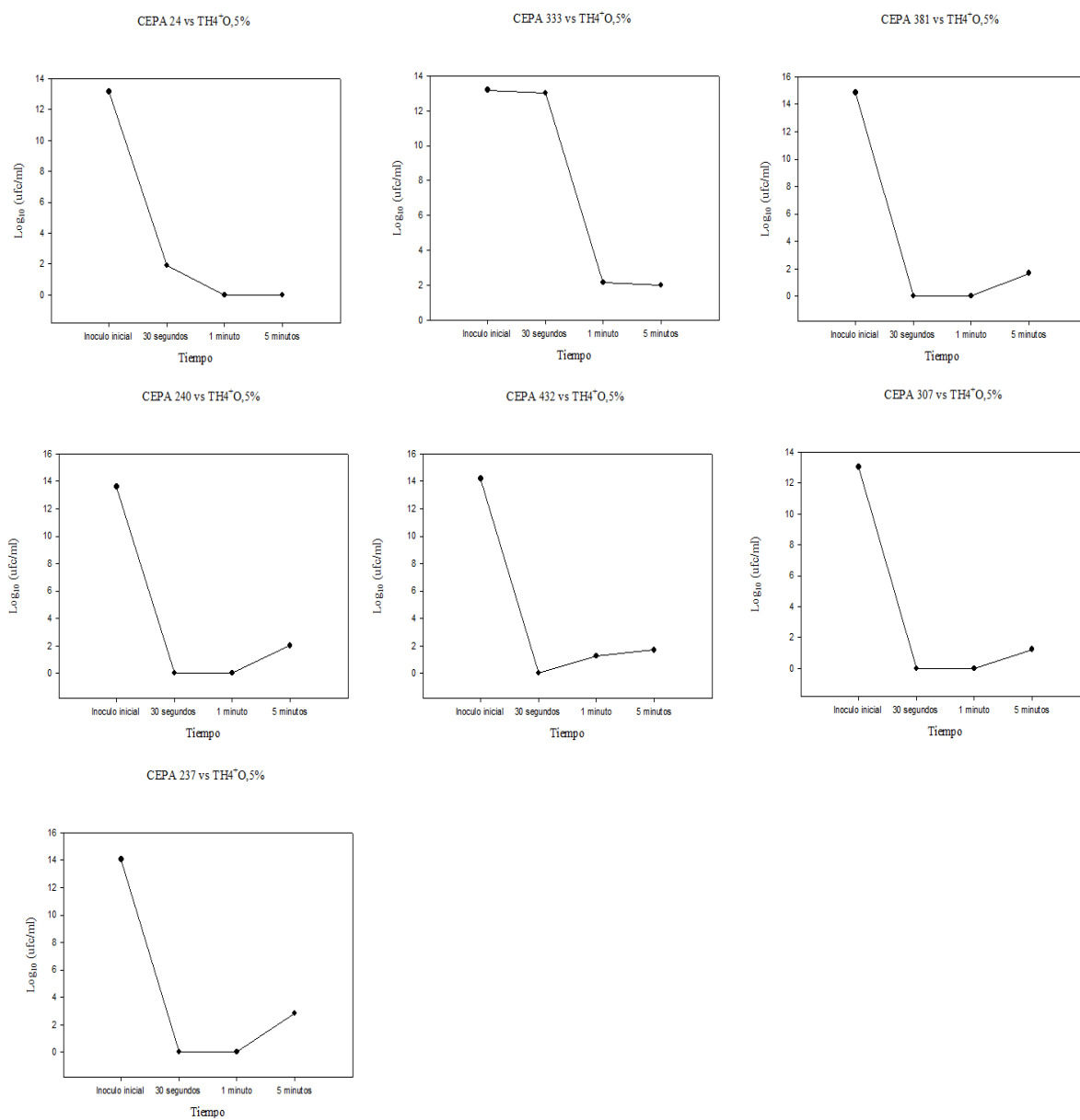


Figura 10. Evaluación del desinfectante TH4+ a una concentración de 0,5% frente a cada una de las cepas de *Salmonella* spp. estudiadas.

ANEXO 4

Preparación de medios de cultivo.

1. Agar TSA.

Componentes	g/L
Por componentes	
Tripteína.	5
Peptona de soya	30
Agar	15.0
Cloruro de sodio	7.2
Agua destilada	1000
pH	7.2

Preparación: Disolver 40 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118121°C.

2. Caldo Letheen

Componentes	g/L
Por componentes	
Peptona de carne	10.0
Lecitina de soya	0.7
Cloruro de sodio	5.0
pH	7.2
Agua destilada	1000
Agregado de Tween 80 o Tween 20.	

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada. Agregar 5 ml de polisorbato 80 (Tween 80). Aunque hay

productos comerciales que ya lo contienen. Distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Neutralizante por componentes

Componentes	L
Peptona	1%
Cloruro de sodio	0,5%
Tiosulfato	6 g
Fosfato de sodio	3,5 g
Agua destilada	1000

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada. Distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo BHI (infusión Cerebro Corazón)

Componentes	g/L
Por componentes	
Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8.0
Digerido péptico de tejido animal	5.0
Digerido pancreático de caseína	16.0
Cloruro sódico	5.0
Glucosa	2,0
Agua destilada	1000
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5
pH	7,4 ± 0,2

Preparación: Pesar cada uno de los componentes o el producto comercial y depositar en un recipiente de vidrio que soporte el proceso de esterilización. Adicionar 1000 mL de agua destilada. Distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 5.

Preparación de reactivos

1. Agua peptona al 0.1 % m/v

Pesar 1 g de peptona universal y disolver en 1000 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1N o HCl 1N; depositar el volumen requerido en los recipientes de vidrio y esterilizar por 15 minutos a 15 libras de presión.