

INTRODUCCIÓN

Las micobacterias incluyen varias especies causantes de importantes enfermedades en humanos y animales, según el punto de vista patogénico existen tres grupos de riesgo (tabla 1) (Casal M. & Casal M. 2000). *Mycobacterium tuberculosis*, es el agente causal de la tuberculosis y actualmente genera un gran número de muertes a escala mundial, las micobacterias que se encuentran en el medio ambiente son causa creciente de enfermedades oportunistas en individuos inmunosuprimidos en los que la susceptibilidad a la infección por micobacterias se ve claramente aumentada (Horsbrugh CR. 1991.& Sack JB. 1990.). Crespo y colaboradores (1994) demostraron que hay un aumento del 27% en la prevalencia de infecciones por micobacterias no tuberculosas (MNT) frente a un 6.5% de aumento en la prevalencia de la tuberculosis (TB) en personas VIH positivas.

La principal característica de persistencia del género *Mycobacterium* en el ambiente es su resistencia por la reducción de la permeabilidad celular por medio de de síntesis de paredes celulares particularmente ricas en lípidos y por el desarrollo de vías de transporte que contribuyen esta disminución en la permeabilidad (Cardoso S., *et al.* 2004). La resistencia sumada a la ubicuidad de las MNT, aumentan la diseminación de estas bacterias en todo tipo de superficies e instrumentos de uso clínico, de laboratorio, odontológico y quirúrgico que son reutilizables y generalmente no autoclavables, estos; al ser rehusados pueden desencadenar infecciones en individuos tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes, cuando no son correctamente desinfectados (Crespo M, Corral R & Alzate A. 1997; Rivera I, *et al.* 2006.; García I.,*et al.* 2002; Gómez R., *et al.* 2004; Zaballos P., *et al.* 2002 & Solar M., *et al* 2005).

Se han reportado numerosos casos de infecciones micobacterianas posteriores a tratamientos invasivos de carácter quirúrgico y cosmético como acupuntura, liposucción o mesoterapia asociados particularmente a la mala desinfección de instrumentos por parte del personal encargado. Estas infecciones cutáneas y de tejidos blandos son causadas principalmente por *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. simiae* entre otras (Zaballos P., *et al.* 2002, García I.,*et al.* 2002, Gómez R., *et al.* 2004 & Herrera M. 2004.).

Comercialmente se dispone como única alternativa comprobada para la eliminación de micobacterias del material de uso clínico, de los desinfectantes de alto nivel, como por ejemplo el Cidex OPA (ortoftalaldehido) capaz de eliminar en alto porcentaje estas bacterias (Bello T, Rivera I y de Waard J. 2006.), no obstante es muy costoso y su uso no es frecuente en los centros de salud y/o de estética. Es claro entonces que existe la necesidad de buscar el desarrollo de un desinfectante con suficiente efecto micobactericida y que pueda ser comercializado de manera más económica, a su vez el uso seguro de este puede contribuir a la disminución del número de casos de micobacteriosis posteriores a tratamientos invasivos.

En este caso el ácido hipocloroso (desinfectante), es un potencial candidato que cumple con las características necesarias para su uso. Este desinfectante puede ejercer una rápida y selectiva inhibición del crecimiento bacteriano y división celular comprobada en otras especies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *E coli*, *Klebsiella pneumonie*, *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Henaó S., et al. 2003 & Mckenna S & Davies K, 1988), su efectividad en micobacterias aun no ha sido probada por lo que en este trabajo se evaluara dicho efecto según las normas internacionales de desarrollo de nuevos desinfectantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto bactericida del ácido hipocloroso mediante ensayos *in vitro*, en tres especies del género *Mycobacterium* de acuerdo a las normas internacionales de desarrollo de nuevos desinfectantes.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima bactericida del ácido hipocloroso mediante ensayos *in vitro*.
- Determinar la concentración mínima para uso como desinfectante en material clínico mediante ensayos *in vitro*.
- Comparar la efectividad del ácido hipocloroso con el desinfectante de alto nivel Cidex OPA (ortophtaraldehído) mediante ensayos *in vitro*.

3. PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Las micobacterias ambientales se encuentran distribuidas fundamentalmente en el agua y la tierra (Primm T *et al.* 2004 & Luna C. 2001), se diferencian de los patógenos obligados; *M. tuberculosis* y *M. leprae* en que son de vida libre, aunque en algunas ocasiones se encuentran como saprofitos comensales y simbioses de otros organismos (Primm T *et al.* 2004). Algunas de las micobacterias ambientales se nombran como patógenos emergentes; ósea que no se transmiten personas a persona pero que son causantes de infecciones oportunistas carácter pulmonar, diseminadas o cutáneas en humanos y animales (Dantec C *et al.* 2002 & Morris A. & Harrison A. 2003). Las infecciones diseminadas son comunes en individuos inmunocomprometidos y las cutáneas en personas que han sido sometidas a tratamientos invasivos que comprometen los tejidos blandos (Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez Alfonzo R, Piquero J, *et al.* 2006 & Del Solar *et al.* 2005). Las especies que comúnmente se reportan como causantes de estas enfermedades son: *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. simiae* (Herrera M. 2004)

Por otro lado las micobacterias son resistentes a variados medicamentos y así mismo a desinfectantes, esto se ha atribuido a su baja permeabilidad, la cual es generada principalmente por el alto contenido de lípidos complejos en la superficie de la pared celular, su principal componente son los ácidos micólicos (ácidos β -hidroxy), los cuales se encuentran unidos por enlaces covalentes al peptidoglucano a través de arabinanos y galactanos y por la poca cantidad de porinas con cargas negativas que permiten solo el paso (regulado por voltaje) de aquellas moléculas que están cargadas positivamente, bastan pequeñas diferencias de potencial entre ambos lados del canal para cerrarlo y contribuir así a la baja permeabilidad de la pared celular (Totoli, E. 2003 & Trias J. 1994 & Primm T *et al.* 2004).

De la misma manera; el ingreso de biocidas a la micobacteria a través de la pared es difícil y bajo; por lo que no es suficiente para inhibir su crecimiento o causarle la muerte. Sin embargo los desinfectantes de alto nivel como el Cidex OPA (ortoformaldehído), son capaces de ejercer efecto tuberculicida recomendándose para uso en instrumentos y

superficies contaminadas, no obstante su uso es restringido debido a su alto costo (Bello T, Rivera I y de Waard J. 2006).

Una posible solución al problema planteado es el uso del ácido hipocloroso, que además de ser económico, es un compuesto activo inhibidor de reacciones enzimáticas claves para la célula, desnaturizante de proteínas bacterianas e inactivador de ácidos nucleicos. Este tipo de desinfectante es activo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Klebsiella pneumoniae*, y algunos hongos (Molina R. & García O. 2003 & Henao S., Sierra C. & Gaitan J. 2003). El ácido hipocloroso es un compuesto antimicrobiano 100 veces más potente que el peróxido (H_2O_2) al que no se le ha comprobado su actividad contra micobacterias, lo que justifica la realización de pruebas de efectividad en estos organismos (Chesney, J. *et al.* 1996 & Schraufstatter, I. *et al.* 1990).

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 *Mycobacterium*

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia Micobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales (Cardoso S., *et al.* 2004). Las micobacterias y taxones emparentados se distinguen fácilmente del resto de bacterias por su capacidad de sintetizar ácidos micólicos (Rastogi N. *et al.*, 2001). Las Micobacterias son ubicuas y generalmente se pueden encontrar tanto en muestras ambientales de suelo, agua, leche y otros alimentos, así como en animales domésticos y salvajes; la transmisión persona a persona es muy rara pero se adquieren fácilmente por inhalación o ingestión (Crespo M, Corral R & Alzate A. 1997 & Cardoso S., *et al.* 2004).

De los tres grupos de Micobacterias (Tabla 1), el primero incluye patógenos estrictos en el hombre y animales que por lo general no se encuentran en el ambiente; tales como *M. tuberculosis* y *M. leprae*, el segundo está conformado por Micobacterias potencialmente patógenas o “micobacterias oportunistas” las cuales se encuentran en la naturaleza y también son causantes de enfermedades en hombres y animales, finalmente el tercero es el de las saprofitas éstas no son patógenas, aunque hay algunas excepciones (Cardoso S., *et al.* 2004).

Tabla 1 Clasificación de Micobacterias de acuerdo al tipo de infección en humanos

PATOGENOS ERICTOS	POTENCIALMENTE PATOGENOS	USUALMENTE SAPROFITICOS
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. abscesus</i> <i>M. avium</i>	<i>M. gastri</i> <i>M. smegmatis</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. flavescens</i> <i>M. nonchomogenicum</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. intracellulare</i> <i>M. asiaticum</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. gordonae</i>
<i>M. microti</i>	<i>M. celatum</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. vaccae</i> <i>M. aurum</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. haemophilum</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. triviale</i> <i>M. thermoresistible</i>
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. malmoense</i> <i>M. genavense</i>	
	<i>M. marinum</i> <i>M. kansasii</i>	
	<i>M. ulcerans</i> <i>M. szulgai</i>	
	<i>M. peregrinum</i> <i>M. shimodei</i>	
	<i>M. scrofulaceum</i>	

Las MNTs a nivel mundial se han considerado como causantes de un gran número de infecciones pulmonares y diseminadas en individuos inmunocompetentes pero sobre todo en inmunocomprometidos. En personas VIH positivas se ha visto un predominio de la infección en jóvenes mientras que en personas sin infección por VIH el mayor predominio de infección por MNTs está en los mayores de 50 años (Crespo M, Corral R & Alzate A. 1997).

Las micobacterias se pueden identificar por características fenotípicas y genotípicas. Las fenotípicas; son principalmente la tasa de crecimiento (lentas y rápidas) y pigmentación dividida en tres, las fotocromogénicas (pigmentación postexposición a la luz), escotocromogénicas (Pigmentación en ausencia o presencia de la luz) y no cromogénicas (no pigmentación) (Cardoso S., *et al.* 2004) (Anexo A y B).

4.2 Características de resistencia del género *Mycobacterium*

Las Micobacterias poseen diferentes estrategias que les confieren resistencia ante circunstancias ambientales o inducidas por el hombre; una de ellas es la presencia de la enzima catalasa, la cual les permite ser resistentes a concentraciones variadas de peróxido de hidrógeno en el ambiente (ya sea intracelularmente o en superficies). Por otro lado su pared celular tiene muy baja permeabilidad debido a la riqueza en lípidos, que causa una alta hidrofobicidad (Cuesta G., 2004 & Beran V. *et al.*, 2006). Los ácidos micólicos que son de alto peso molecular como los ácidos grasos α alquil β hidroxil están unidos covalentemente al peptidoglicano y arabinogalactano polisacáridos importantes en la pared celular (Figura 1). La presencia de estos compuestos hace que las Micobacterias sean fuertemente ácido-alcohol-resistentes (Cardoso S., *et al.* 2004, Basso L. *et al.* 2005 & Cuesta G., 2004).

Otra característica de resistencia relacionada a la permeabilidad, es el transporte por medio de porinas, las cuales generan un canal que permite el paso selectivo de las moléculas de un lado a otro de la pared celular, estas proteínas tienen cargas negativas, por donde solo pasan aquellas moléculas que están cargadas positivamente, regulándose de esta manera la apertura o cierre de dicho canal celular (Trias J. 1994).

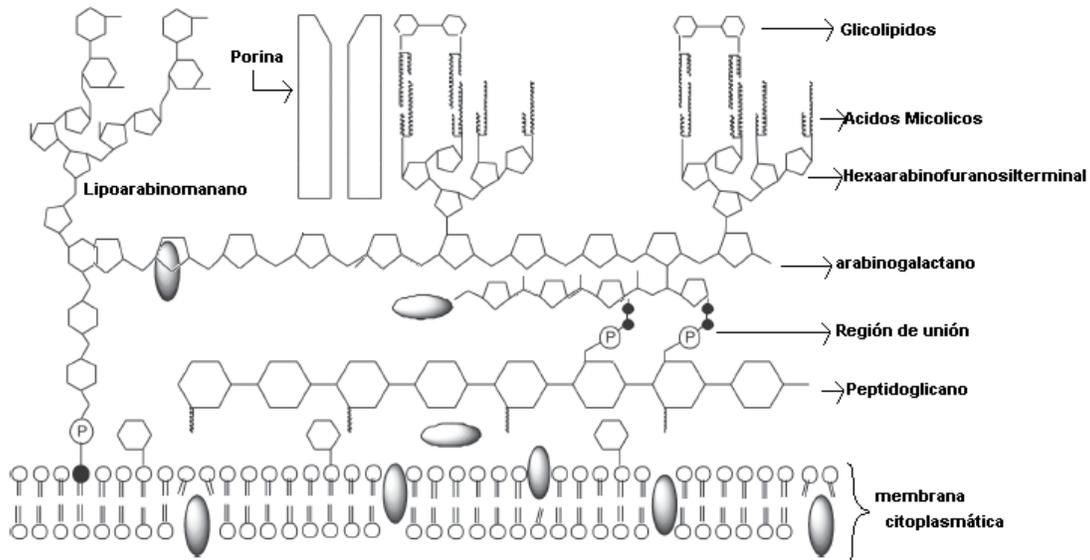


Figura 1 Pared celular micobacteriana. Peptidoglicano, unido al arabinogalactano por un ligando de fosfatodisacárido. El arabinogalactano unido a una cadena de polisacáridos. Ácidos Micólicos, mostrados perpendicularmente a la membrana citoplasmática y también están unidos al peptidoglicano y arabinogalactano. También está el lipoarabinomano componente inmunogénico que está unido a la membrana por fosfatidilinositol. Canales proteicos (porinas). (Modificado de Basso L *et al*, 2005).

Las micobacterias además de poseer esta sofisticada pared celular, también tienen características metabólicas que les facilitan vivir en variados lugares y superficies, además crecen en condiciones microaerófilas y son resistentes a los agentes antituberculosos (Cardoso S., *et al*. 2004 & Crespo M, Corral R & Alzate A. 1997).

Las micobacterias patógenas están extraordinariamente adaptadas a establecer infecciones por largo tiempo que pueden manifestarse con enfermedades agudas o crónicas, o ser clínicamente asintomáticas con el potencial de reactivarse. Aunque las micobacterias patógenas y no patógenas pueden entrar a células eucariotas con la misma facilidad, solamente las especies patógenas pueden sobrevivir y replicarse dentro de ellas (Cosma C, Sherman D & Ramakrishnan L. 2003).

4.3 Desinfectantes

Los desinfectantes destruyen diferentes microorganismos, pero estos solo se deben aplicar en superficies o instrumentos y su actividad, se debe revisar en detalle con respecto a la compatibilidad con los equipos. Para la elección de un desinfectante es muy

importante tener en cuenta la toxicidad, el olor, la compatibilidad con otros compuestos y el posible efecto residual (Molina R. & García O. 2003 & Garzón L., *et al*, 2004). Los desinfectantes son muy utilizados en los hospitales y consultorios médicos donde tienen un rol fundamental para el control y la prevención de las infecciones nosocomiales; su eficacia depende de factores como el tipo de desinfectante, tiempo de acción, temperatura, concentración, pH, configuración del objeto a tratar, factores físicos y químicos del medio, presencia de materia orgánica (restos de suero, sangre, pus o materia fecal) y la naturaleza de los microorganismos presentes (Bello T., *et al* 2006).

Algunos desinfectantes como los clorados y yodados son sensibles a la inactivación por presencia de materia orgánica en el medio, por lo tanto siempre se hace necesario la limpieza de todos los elementos que se van a desinfectar o a esterilizar antes ponerlos en contacto con el desinfectante a utilizar (Molina R. & García O. 2003). Los tipos de desinfectantes de mayor uso se describen a continuación:

- **Alcoholes:** son compuestos hidrosolubles y los más utilizados son el alcohol etílico y el alcohol isopropílico. La concentración óptima bactericida está en el rango del 60 al 90% por volumen. Sin embargo este desinfectante no tiene actividad contra esporas y es incapaz de penetrar materiales ricos en proteínas (Molina R. & García O. 2003).
- **Cloro y Compuestos Clorados:** los hipocloritos son los compuestos más ampliamente usados y su presentación es en forma líquida (hipoclorito de sodio) o sólida (hipoclorito de calcio), las condiciones que favorecen la estabilidad de los cloruros son: la temperatura ambiente, las soluciones diluidas, las soluciones alcalinas y el almacenamiento en empaques opacos y cerrados. Estos son compuestos son de amplio espectro, bajo precio y rápida acción, sin embargo su uso está limitado por su efecto corrosivo, su inactivación por materiales orgánicos, su inestabilidad relativa y su toxicidad, ya que los gases del cloro son irritantes para el tracto respiratorio y pueden producir tos, disnea, edema pulmonar y neumonía química (Molina R. & García O. 2003).

El compuesto activo que se libera de los compuestos clorados es el ácido hipocloroso (HClO), postulándose que puede inhibir reacciones enzimáticas claves para la célula,

desnaturalizar proteínas bacterianas e inactivar ácidos nucleicos (Molina R. & García O. 2003). Este tipo de desinfectante es activo contra bacterias, hongos, entre otros (Molina R. & García O. 2003). El HClO es altamente reactivo y no se acumula en sistemas biológicos. Además dicho compuesto es un oxidante poderoso y aproximadamente un antimicrobiano 100 veces más potente que el peróxido (H_2O_2) (Chesney, J. *et al.* 1996) pudiendo degradar estructura proteica e inactivar enzimas (Schraufstatter, I. *et al.* 1990).

Comercialmente el ***Neutrobac*** posee como compuesto activo el ácido hipocloroso, el ión no disociado del cloro, responsable de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro, como tal no es corrosivo ni cáustico y es conocido como un potente desinfectante (Henaó S., Sierra C. & Gaitan J. 2003). Como desinfectante bactericida, el HClO penetra fácilmente en la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática, actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos; oxida grupos sulfhídricos (-SH) y ataca grupos aminos, indoles y al hidroxifenol de la tirosina.

La acción bactericida del hipoclorito de sodio se debe al HClO y al cloro gaseoso (Cl_2) que se forman cuando el hipoclorito es diluido en agua, a pH menores de 7.5 se favorece la generación de HClO y a pH mayores tiende a generar ion hipoclorito (ClO^-), el cual tiene una actividad reducida debido a su carga eléctrica y no atraviesa fácilmente la membrana celular. La efectividad estimada del ion hipoclorito es del 1% comparada con la del ácido hipocloroso; de esta manera, a un pH=6.0 se necesitan 0.005 ppm de cloro como HClO para obtener la misma acción biocida que con 0.5 ppm de cloro como ClO^- a un pH= 10.

Estos hipocloritos como el de sodio o de calcio, son tóxicos al contacto con la piel y mucosas a diferencia del ácido hipocloroso (Henaó S., Sierra C. & Gaitan J. 2003). Este compuesto (el ácido hipocloroso) tiene la propiedad de ser oxidante, es decir éste tiene en cada átomo de oxígeno un electrón impar para su órbita externa, lo que le confiere la condición de radical libre y la molécula de oxígeno tiene 2 electrones impares, o sea, es un birradical libre (Pérez L., 2000). El ácido hipocloroso se disocia en iones hidrógeno (H^+) e hipoclorito (OCl^-) y cuando se adiciona al agua, el cloro oxida a la materia orgánica e inorgánica por igual. Por lo que no todo el cloro que se agrega al agua da por resultado

la producción de cloro libre disponible. La cantidad de cloro que reacciona con los compuestos inorgánicos (Fe^{2+} , Mn^{2+} , NO_2 , NH_3) y con las impurezas orgánicas se conoce como la demanda de cloro, siendo necesario satisfacerla para que se forme cloro libre disponible (Liñan A., Rodríguez C., Barbarín J. & Huerta O. 2002).

- **Glutaraldehído:** las soluciones ácidas de glutaraldehído al 2% adquieren su actividad máxima a un pH 7,5 a 8,5; y a temperatura ambiente destruye formas bacterianas en 2 minutos, micobacterias, hongos e inactiva virus en menos de 20 minutos y elimina esporas de *Clostridium* y *Bacillus* en 3 horas (Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002 & Molina R. & García O. 2003). Éste tiene una vida media de 14 días, porque las moléculas de glutaraldehído se van polimerizando, lo que bloquea los grupos aldehído que son el sitio activo (biocida) (Molina R. & García O. 2003). La actividad antimicrobiana también depende de condiciones como la dilución, la concentración y la temperatura (es mayor al aumentar la temperatura). Es un compuesto no corrosivo. Su acción está dada por la alquilación de los grupos sulfidril, hidroxil, carboxil y amino, de los microorganismos, lo cual altera el ADN y la síntesis de proteínas (Molina R. & García O. 2003).

El Glutaraldehído (GTA) ha sido empleado como un desinfectante de alto nivel, este es considerado un mutágeno potencial y su uso en hospitales puede llegar a causar asma y otros efectos como irritación de ojos y piel, reacciones alérgicas, desordenes respiratorios, dolor de cabeza y nauseas. Esos riesgos, y la aparición de algunas cepas resistentes a glutaraldehído han llevado a la búsqueda de alternativas más eficientes que este producto (Herruzo Cabrera R., *et al* M.J. 2004).

- **Ortoftalaldehído (Cidex OPA):** el ortoftalaldehído (OPA) es un desinfectante de alto nivel, el cual muestra un efecto bactericida a una concentración de 0.55% y no necesita de un agente de activación, permaneciendo estable por al menos 14 días. OPA puede reducir a las micobacterias en un factor de 10^5 en 5 minutos, éste tiene algunas ventajas sobre GTA: 1) no necesita ser activado; 2) no es irritante; 3) El olor es casi indetectable; 4) Es estable sobre un amplio rango de pH (pH 3-9). El efecto más notable es que mancha la ropa (Herruzo Cabrera R., *et al* M.J. 2004).

Finalmente, existe otra serie de desinfectantes que son efectivos para ciertos microorganismos y que son muy usados debido a sus diferentes características, entre estos se encuentra el peróxido de hidrógeno que tiene bajo nivel de toxicidad para los humanos, se descompone en oxígeno y agua y actúa por la formación de radicales libres; otro es el formaldehído, el cual tiene principalmente una solución acuosa llamada formalina; por otro lado tenemos los Compuestos de Amonio Cuaternario (Cloruro de benzalconio, cloruro de alquildimetilbenzilamonio y cloruro de didecildimetilamonio), éstos, que son ampliamente utilizados como desinfectantes no deben ser usados como antisépticos ya que bacterias Gram negativas crecen y sobreviven en ellos, además no son micobactericidas, ni esporicidas haciéndolos desinfectantes de bajo nivel. La clorhexina es un producto antiséptico muy poco irritante para la piel y de amplio espectro aunque en solución acuosa no afecta a las micobacterias. Por último están los yodoforos que son una combinación de yodo y un agente portador; este complejo resulta en un reservorio que descarga pequeñas cantidades de yodo libre en una solución acuosa, conservando la actividad germicida del yodo y a diferencia de éste, no manchan y son relativamente libres de efectos tóxicos irritantes, penetran la pared celular de los microorganismos con gran rapidez y su efecto letal está dado por la ruptura de proteínas y ácidos nucleicos, al igual que la inhibición de su síntesis. Aunque son bactericidas, micobactericidas y virucidas, pueden requerir un contacto prolongado para matar ciertos hongos y esporas bacterianas (Molina R. & García O. 2003).

5. METODOLOGÍA

5.1 Selección de la Muestra y Tipo de Estudio

Este trabajo corresponde a un estudio experimental del comportamiento de 3 especies de Micobacterias no tuberculosas potencialmente patógenas (*M. chelonae*, *M. intracellulare* y *M. fortuitum*) ante diferentes concentraciones del ácido hipocloroso (Biocida).

5.2 Recuperación de las Especies y Determinación de la Viabilidad

Antes de realizar la exposición y la prueba de viabilidad post exposición de cada especie fue necesario obtener abundante inóculo bacteriano, suficiente para realizar la solución del tubo madre con una turbidez igual a la del tubo tres en la escala de Macfarland (9×10^8 UFC). Las especies *M. intracellulare*, y *M. fortuitum* corresponden a cepas de referencia ATCC (Microbiologist) mientras que *M. chelonae* es cepa IP proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical de Bélgica. La viabilidad de las cepas se comprobó contando las UFC resultantes del pase en el medio Middlebrock 7H10 (Henao S. *et al*, 2003.), previo a la exposición del desinfectante.

5.3 Exposición directa al Acido Hipocloroso

Para cada especie se evaluó en 4 intervalos de tiempo (5, 10, 15, y 20 minutos), ante 5 diferentes concentraciones del ácido hipocloroso (225, 450, 750, 900 y 1500 partes por millón (ppm)) por duplicado.

La solución madre de Acido Hipocloroso (concentración comercialmente disponible para desinfección) contiene una concentración de 1500 partes por millón (ppm) la cual fue diluida en agua destilada obteniendo concentraciones de 225, 450, 750, 900 y 1500 ppm, las cuales se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad.

La suspensión bacteriana de cada micobacteria se realizó en agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a la del tubo 3 de la escala de Mac Farland; equivalente a un inóculo aproximado de 9×10^8 (900'000.000) unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

En una microplaca de polietileno de 96 pozos nueva y estéril (Figura 2a) se adicionaron 25µl de la suspensión bacteriana y 125µl del desinfectante a las diferentes concentraciones, se dejó actuar en cada uno de los intervalos de tiempo establecidos, estos se delimitaron adicionando 150µl de la solución neutralizante de tiosulfato de sodio al 0.6%.

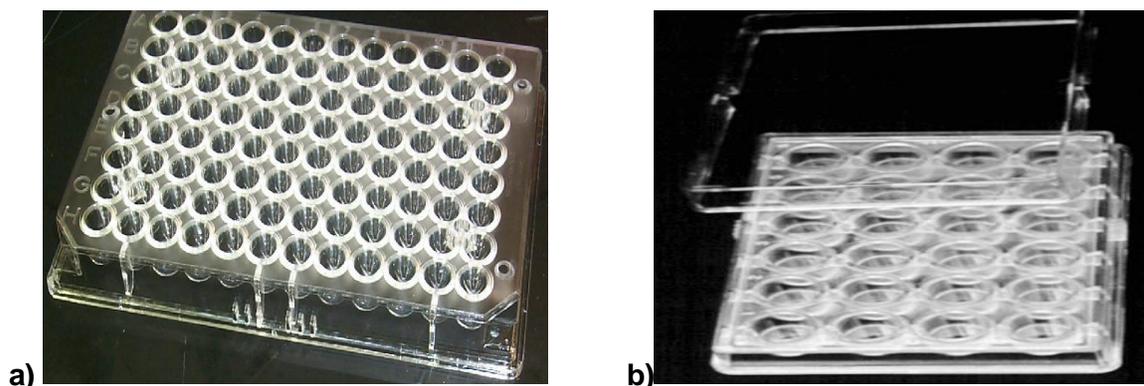


Figura 2 Microplacas de poliestireno. a) Microplaca de 96 pozos y b) Microplaca de 24 pozos.

5.4 Actividad del Acido Hipocloroso con interferente

El control de la actividad del biocida se evaluó mezclando las suspensiones bacterianas con una solución de albúmina sérica bovina al 5% filtrada en membrana millipore de 0,22 µm. La albúmina sérica bovina al 5% se usa para probar la efectividad del desinfectante en presencia de proteínas, ya que estas pueden influenciar la efectividad del biocida y disminuir la concentración efectiva de este. A una placa de polietileno de 24 pozos (figura 2b) se le agregaron 170 µl del inóculo bacteriano, que se encontraba en una solución madre de 9×10^8 UFC, mas 100 µl de albúmina al 5%, 730 µl del desinfectante (HClO) y 1000 µl del neutralizante al pasar cada intervalo de tiempo.

5.5 Prueba en portagermenes (superficies contaminadas)

Para la prueba de superficie se uso un soporte metálico (limas de endodoncia de 25 mm), contaminado por inmersión en una suspensión de micobacterias igual a la del tubo tres en la escala nefelométrica de Macfarland (9×10^8 UFC) durante una hora, luego se dejó secar

durante 15 minutos sobre una superficie estéril. Cada lima se introdujo en un recipiente con 3 ml de la concentración respectiva de ácido hipocloroso (750, 900 y 1500 ppm) con perlas de vidrio de 1mm de diámetro durante 5, 10, 15 y 20 minutos y se adiciono 3 ml del inhibidor tiosulfato de sodio al 0.6% pasados 10 minutos se agito a 1000 rpm por sesenta segundos, finalmente se tomo 0.05 ml del sobrenadante para realizar la prueba de viabilidad (Henaó S., Sierra C. & Gaitan J. 2003, Herruzo Cabrera R., Vizcaino M.J., Fernández Aceñero M.J. 2004, Herruzo-Cabrera R., Vizcaino MJ., Rodríguez J. 2006 & Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002).

5.6 Prueba de Viabilidad Post-Exposición

Posterior a cada tratamiento se realizó la siembra inoculando 50ul de la suspensión final en medio sólido middlebrook 7H11 y se incubó a 37°C hasta observar crecimiento (dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada micobacteria), se realizo el conteo de las colonias sobrevivientes frente al control positivo (Henaó S., Sierra C. & Gaitan J. 2003 & Herruzo Cabrera R., Vizcaino M.J., Fernández Aceñero M.J. 2004).

5.7 Prueba de Corrosión

Las limas de endodoncia, se impregnaron de sangre humana para simular condiciones sucias. Estas se sumergieron en desinfectante a 225, 450, 750, 900 y 1500 ppm por 5, 10, 15, 20 minutos, 24 horas y posteriormente durante una semana, determinándose la corrosión por observación directa.

5.8 Controles

Como control de efectividad se expusieron las 4 especies al Cidex OPA (Johnson & Johnson) como recomienda su fabricante. Como control de crecimiento positivo en cada tratamiento la cantidad de desinfectante se reemplazo por agua para obtener en la siembra el número de colonias de referencia de cada especie expuesta. Como control de crecimiento negativo en cada ensayo el inóculo fue reemplazado por agua para comprobar la pureza de los cultivos al momento de realizar los experimentos (Herruzo Cabrera R., Vizcaino M.J., Fernández Aceñero M.J. 2004). Antes y después de exponer las micobacterias a cada prueba con el desinfectante se realizo tinción Ziehl Nielsen para también verificar la pureza de los cultivos.

5.9 Inóculo real

El inóculo real se calculó a partir de la concentración inicial (9×10^8 UFC) multiplicada por volumen inicial los cuales se mantuvieron constantes para todas las pruebas experimentales divididas en el volumen final, el cual varió de acuerdo a cada ensayo (exposición directa, con interferente o en superficie).

5.10 Determinación de la Efectividad

Se contaron las colonias del control de crecimiento positivo, ello correspondió al 100% de crecimiento bacteriano. Posteriormente se contó el número de colonias sobrevivientes en los diferentes tiempos para cada una de las concentraciones probadas. Así el porcentaje de efectividad se calculó restando al 100% de efectividad el porcentaje de UFC capaces de resistir la acción bactericida del ácido hipocloroso a una concentración y tiempo determinado. Además, se calculó el tiempo mínimo de acción del desinfectante capaz de eliminar al menos el 99.9% del crecimiento bacteriano (Henao S., Sierra C. & Gaitan J. 2003).

5.11 Métodos estadísticos

Se determinó normalidad en las variables cuantitativas por medio de la prueba de kolmogorov Smirnov, para definir el tipo de pruebas a utilizar; no fue posible buscar diferencias significativas entre grupos con pruebas paramétricas o no paramétricas dado que cada ensayo experimental se realizó únicamente dos veces, por lo tanto la muestra es insuficiente para la realización de éstas técnicas estadísticas.

Por lo tanto se realizaron gráficos de dispersión para observar la relación entre las UFC y el tiempo de exposición al desinfectante y entre las UFC y las concentraciones de ácido hipocloroso, se calculó el coeficiente de correlación de Kendall para variables ordinales y se determinó el valor del coeficiente de correlación para determinar el porcentaje de variabilidad común entre las variables de estudio, por medio del programa SPSS versión 14. Estas pruebas se realizaron sólo para los resultados obtenidos en el ensayo de desinfectante con interferente para *M. chelonae* y *M. intracellulare*, ya que los datos obtenidos en *M. fortuitum* son muy bajos y no se pueden evaluar con mencionadas pruebas.

6. RESULTADOS

6.1 Viabilidad de las Especies

Todos los inóculos bacterianos, fueron viables antes de la exposición al desinfectante y en los controles de cada prueba, observándose por ejemplo la presencia de unidades formadoras de colonias en los controles positivos, realizados para cada especie y en cada prueba, como se ha indicado previamente en la metodología.

6.2 Pureza de los cultivos micobacterianos

La tinción Ziehl Nielsen positiva y los controles negativos, en la prueba de viabilidad, mostraron la pureza obtenida en los cultivos durante el experimento (figuras 4a y 4b).

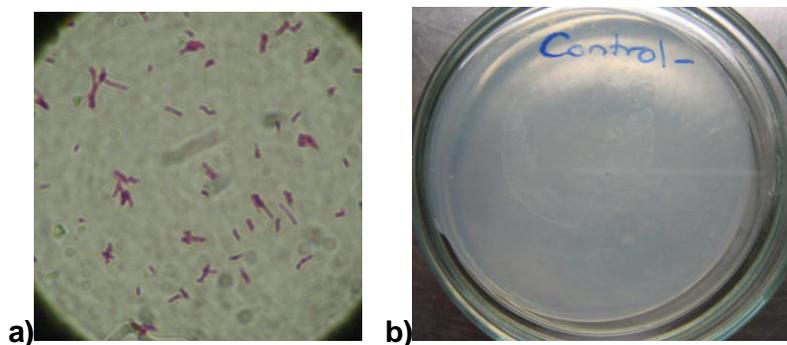


Figura 3. Asepsia de los cultivos expuestos al desinfectante. **a)** Tinción Ziehl Nielsen de *M. fortuitum* y **b)** Control negativo en las diferentes pruebas con el desinfectante.

6.3 Exposición directa al ácido hipocloroso

El inóculo real para esta prueba fue de 75'000.000 UFC, de las cuales se observaron diferentes valores para cada control positivo. Para *M. chelonae*, el número de UFC fue 440, ésta es una micobacteria de crecimiento rápido (< a 7 días) el tiempo límite en donde se observó crecimiento para este trabajo fue de 4 días, para *M. fortuitum*, el número de UFC fue 22, siendo ésta una micobacteria de crecimiento intermedio (< ó = a 7 días), el tiempo de observación de UFC fue también de cuatro días, mientras que para *M. intracellulare* micobacteria de crecimiento lento (> 7 días), el tiempo límite de observación fue de 15 días, con un número de UFC igual a 4416.

La efectividad del desinfectante en las micobacterias no tuberculosas aquí evaluadas, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. intracellulare*, por exposición directa (condiciones limpias) fue de 100% (tabla 2), ya que no se observó crecimiento en ningún tiempo y concentración respectivo (figura 4 a, b y c y tablas 2).

Tabla 2 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y Efectividad de *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. intracellulare* en la prueba de exposición directa al ácido hipocloroso. Efectividad = 100% - % de UFC capaces de resistir la acción bactericida del ácido hipocloroso

Concentración	UFC por cada intervalo de tiempo				EFECTIVIDAD
	5'	10'	15'	20'	
225	0	0	0	0	100%
450	0	0	0	0	100%
750	0	0	0	0	100%
900	0	0	0	0	100%
1500	0	0	0	0	100%
Controles	<i>M. chelonae</i> 440 UFC; <i>M. fortuitum</i> 22 UFC; <i>M. intracellulare</i> 4416 UFC				

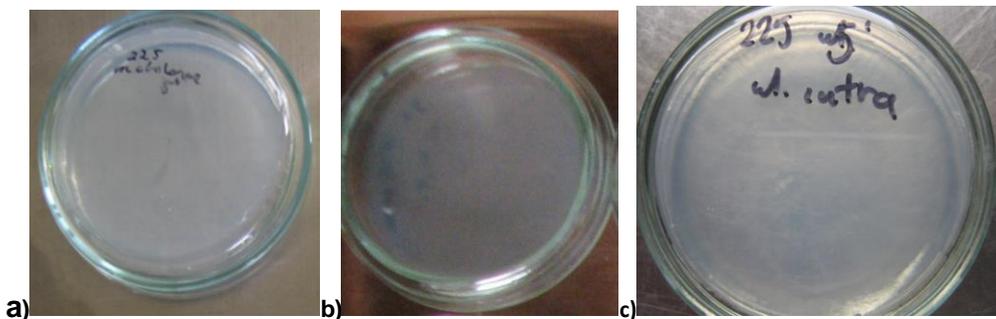


Figura 4 Prueba de exposición directa al ácido hipocloroso de las especies evaluadas. a) *M. chelonae*, b) *M. fortuitum* y c) *M. intracellulare*.

6.4 Actividad del ácido hipocloroso con interferente

El inóculo real utilizado para esta prueba fue igual a 74'700.000 UFC. La prueba del desinfectante en presencia de albúmina al 5% como interferente, mostró que para cada especie la concentración a la que era 100% efectivo, fue diferente (tablas 3-8), siendo 1500 ppm la concentración con al menos el 90% de efectividad del desinfectante en común para las tres especies, en las cuales se redujo bastante el crecimiento con respecto a las otras pruebas o simplemente no se observaron UFC.

Tabla 3 Unidades Formadoras de Colonias de *M. chelonae* en la prueba de actividad del ácido hipocloroso con interferente.

Especie	Concentración (ppm)	UFC por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. chelonae</i>	225	440	440	440	440	435
	450	440	440	440	440	
	750	433	153	148	53	
	900	108	120	66	42	
	1500	1	0	0	0	
	Cidex	0	0	0	0	

Tabla 4 Porcentaje de efectividad del ácido hipocloroso en la prueba con interferente, con *M. chelonae*.

Especie	Concentración (ppm)	% por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. chelonae</i>	225	0	0	0	0	435
	450	0	0	0	0	
	750	0.5	85	66	88	
	900	75.2	75.2	85	90.4	
	1500	99%	100	100	100	
	Cidex	100	100	100	100	

Tabla 5 Unidades Formadoras de Colonias de *M. fortuitum* en la prueba de actividad del ácido hipocloroso con interferente.

Especie	Concentración (ppm)	UFC por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. fortuitum</i>	225	2	2	2	82	22
	450	3	0	9	2	
	750	1	1	0	0	
	900	0	2	0	0	
	1500	0	0	0	0	
	Cidex	0	0	0	0	

Tabla 6 Porcentaje de efectividad del ácido hipocloroso en la prueba con interferente, con *M. fortuitum*

Especie	Concentración (ppm)	% por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. fortuitum</i>	225	91	91	91	-272.72	22
	450	13	100	59	91	
	750	95.5	95.5	100	100	
	900	100	91	100	100	
	1500	100	100	100	100	
	Cidex	100	100	100	100	

Tabla 7 Unidades Formadoras de Colonias de *M. intracellulare* en la prueba de actividad del ácido hipocloroso con interferente.

Especie	Concentración (ppm)	UFC por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. intracellulare</i>	225	10720	10720	10720	0	10720
	450	10720	10720	10720	0	
	750	10720	10720	10720	0	
	900	10720	8320	8320	10720	
	1500	0	80	160	240	
	Cidex	0	0	0	0	

Tabla 8 Porcentaje de efectividad del ácido hipocloroso en la prueba con interferente, con *M. intracellulare*

Especie	Concentración (ppm)	% por cada intervalo de tiempo				Control
		5'	10'	15'	20'	
<i>M. intracellulare</i>	225	0	0	0	100	10720
	450	0	0	0	100	
	750	0	0	0	100	
	900	0	22.4	22.4	0	
	1500	0	99.26	98.51	97.7	
	Cidex	100	100	100	100	

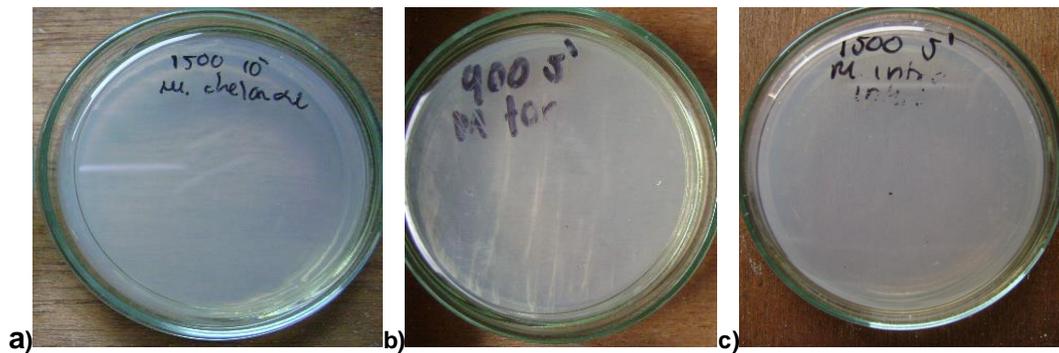


Figura 5 Prueba de actividad del ácido hipocloroso con interferente (albúmina al 5%) a) *M. chelonae*, b) *M. fortuitum*, y c) *M. intracellulare*

6.5 Prueba en portagermenes (superficies contaminadas)

La concentración del inóculo real de esta prueba no es posible calcularlo, ya que el volumen inicial depende como tal de las limas de endodoncia empleadas para llevar a cabo esta prueba. En la prueba de superficie se obtuvieron resultados similares a los de la prueba de exposición directa para cada una de las especies evaluadas, es decir en esta prueba también se observó un 100% de efectividad del desinfectante en todas las concentraciones e intervalos de tiempo, ya que no se observaron UFC para cada una de las exposiciones a diferentes intervalos de tiempo y concentraciones de ácido hipocloroso, con respecto a las unidades formadoras de colonia en los controles positivos (figura 6 y tabla 9).

Tabla 9 Unidades Formadoras de Colonias y Efectividad(UFC) de *M. chelonae* *M. fortuitum* y *M. intracellulare* en la prueba de portagérmenes con el ácido hipocloroso. Efectividad = 100% - % de UFC capaces de resistir la acción bactericida del ácido hipocloroso

Concentración	UFC por cada intervalo de tiempo				EFECTIVIDAD
	5'	10'	15'	20'	
225	0	0	0	0	100%
450	0	0	0	0	100%
750	0	0	0	0	100%
900	0	0	0	0	100%
1500	0	0	0	0	100%
Controles	<i>M. chelonae</i> 205 UFC; <i>M. fortuitum</i> 65 UFC; <i>M. intracellulare</i> 8320 UFC				



Figura 6 Prueba en portagermenes (limas de endodoncia). a) *M. chelonae*, b) *M. fortuitum*, c) *M. intracellulare*.

6. 6 Prueba de Corrosión

En la prueba de corrosión se encontró que el ácido hipocloroso (HOCl) en concentraciones que fluctúan entre 225 y 1500 ppm, pasados los 20 minutos y/o 5 días no genero ningún daño sobre las limas de endodoncia de 25 mm (Figura 7).

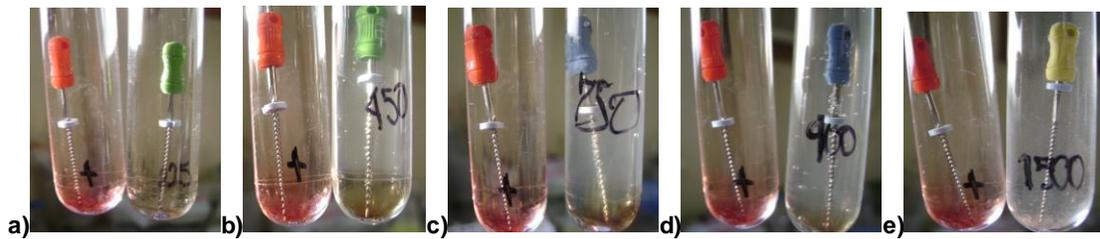


Figura 7 Prueba de Corrosión. a) HOCl 225 ppm, b) HOCl 450 ppm, c) HOCl 750 ppm, d) HOCl 900 ppm y e) 1500 ppm. Lima sumergida en agua sin desinfectante (+).

6.7 Pruebas Estadísticas

Al realizar la correlación, se encontró relación inversamente significativa entre el número de UFC y el tiempo de exposición al ácido hipocloroso en la prueba con interferente a una concentración de 750 ppm (tabla 10), lo cual significa, que la disminución en el número de UFC para dicha concentración es explicada en un 100% por el aumento en el tiempo de

exposición. Con la concentración de 900 ppm el coeficiente fue menos alto y la relación no fue significativa (tabla 10), posiblemente por una variación alta en los datos obtenidos, lo cual está evidenciado por el reducido tamaño de la muestra en cada ensayo (2 réplicas).

Tabla 10 Coeficiente de Correlación de Kendall. UFC de *M. chelonae* a diferentes concentraciones de acuerdo al tiempo de exposición al ácido hipocloroso con interferente.

Coeficiente de Correlación	750 ppm de ácido hipocloroso	900 ppm de ácido hipocloroso
<i>M. chelonae</i>	-1,000	-,667
Sig. (1-tailed)	,021	,087
N	4	4

Al buscar la correlación de las diferentes concentraciones en cada uno de los tiempos, se encontró una relación inversamente significativa en todas; esto significa, que la disminución en el número de UFC, está dada por el aumento de concentración del ácido hipocloroso, para *M. chelonae* (tabla 11) en un 83,3 y 90,1% y para *M. intracellulare* (tabla 12) en un 70,1%, el resto de la variabilidad en el número de UFC no está explicada por la concentración del ácido hipocloroso. Esta correlación se puede ejemplificar con algunas graficas de dispersión que se muestran más adelante, en donde a los 15 y 20 min mientras la concentración aumenta las UFC de *M. chelonae* disminuyen (Figuras 8 y 9), sucediendo lo mismo con *M. intracellulare* (Figuras 10 y 11).

Tabla 11 Coeficiente de Correlación de Kendall. UFC en 4 tiempos diferentes de acuerdo a la concentración de ácido hipocloroso en la prueba con interferente.

<i>M. chelonae</i> N= 5		
Minutos	Coeficiente	Sig. (1-tailed)
5	-,949	,011
10	-,913	,035
15	-,913	,035
20	-,913	,035

Tabla 12 Coeficiente de Correlación de Kendall. UFC en 2 tiempos diferentes de acuerdo a la concentración de ácido hipocloroso en la prueba con interferente

<i>M. intracellulare</i> N= 4		
Minutos	Coeficiente	Sig. (1-tailed)
10	-,837	,026
15	-,837	,026

Los resultados iguales o cercanos a cero no se pudieron analizar por medio de pruebas estadísticas, entre estos se encuentran las UFC obtenidas para todas las especies de micobacterias en pruebas de condiciones limpias (pruebas de exposición directa del ácido hipocloroso y con portagermenes) y en prueba con interferente para *M. fortuitum*. Por otro lado las pruebas estadísticas tampoco se emplearon en los datos donde el crecimiento de UFC sobrevivientes fue igual al control de crecimiento positivo para cada especie en cada uno de los ensayos.

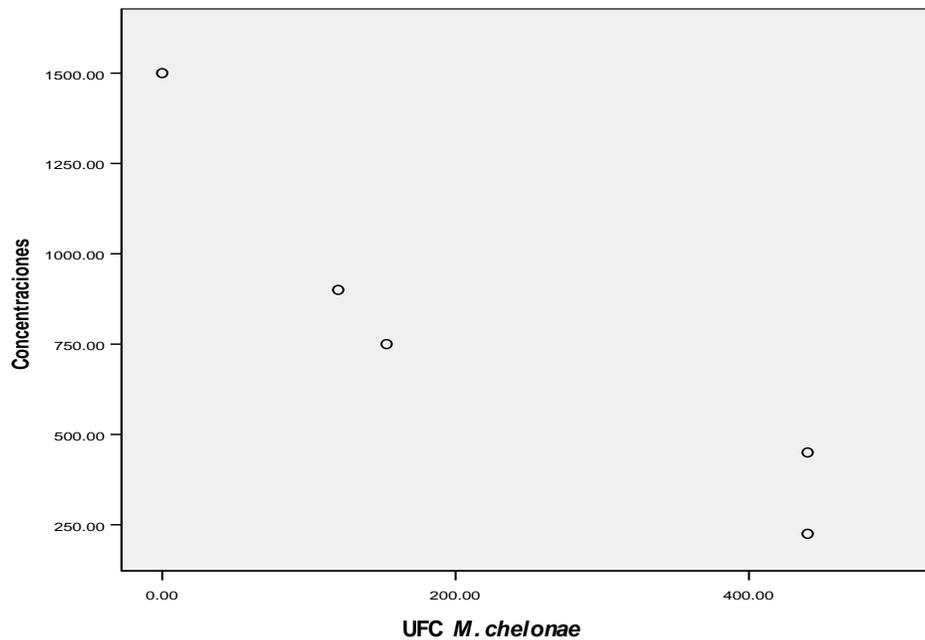


Figura 8 Número de UFC de *M. chelonae* a las diferentes concentraciones durante 10 minutos.

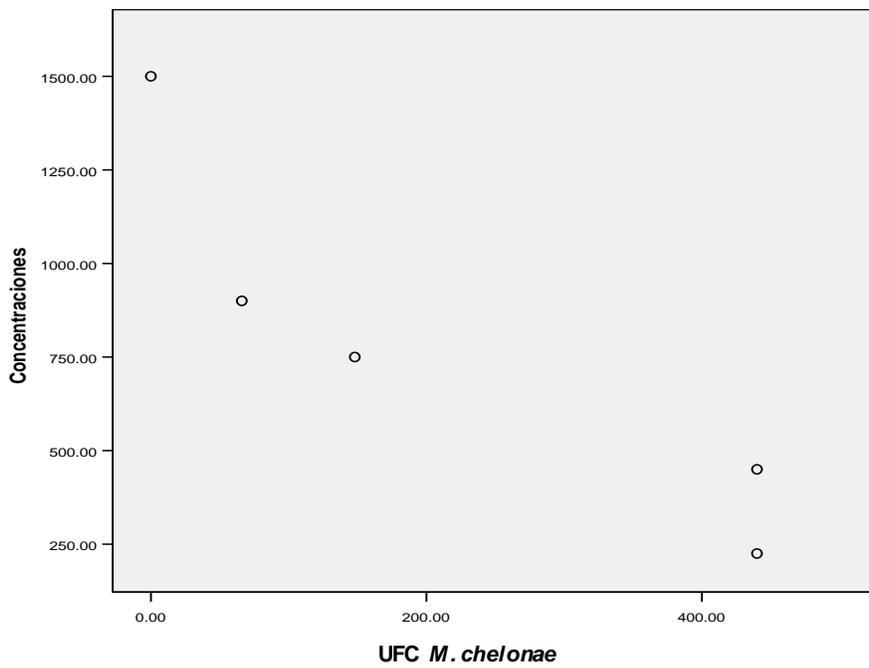


Figura 9 Número de UFC de *M. chelonae* a las diferentes concentraciones.durante 15 minutos.

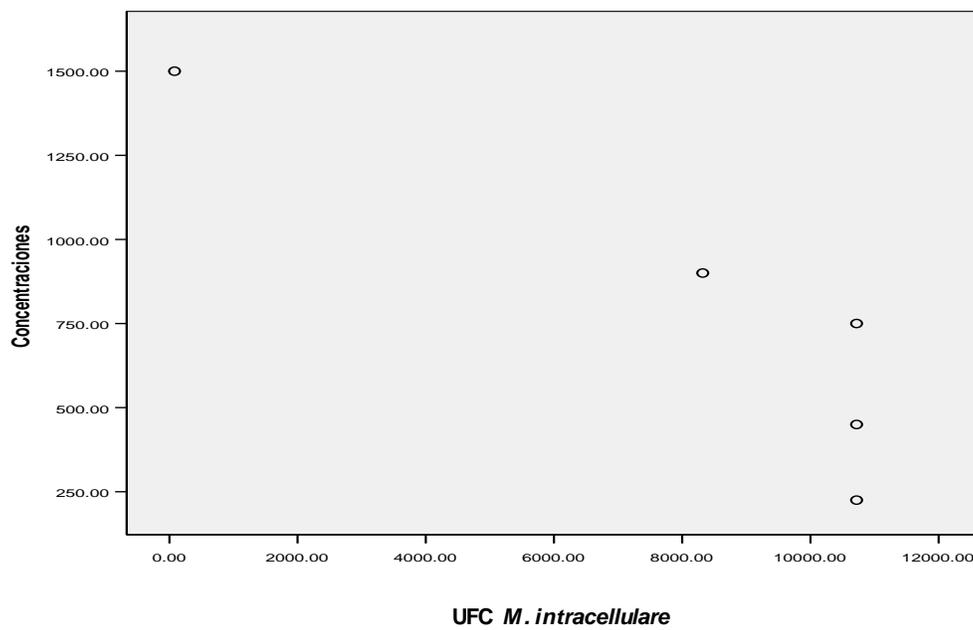


Figura 10 Número de UFC de *M. intracellulare* a las diferentes concentraciones.durante 10 minutos.

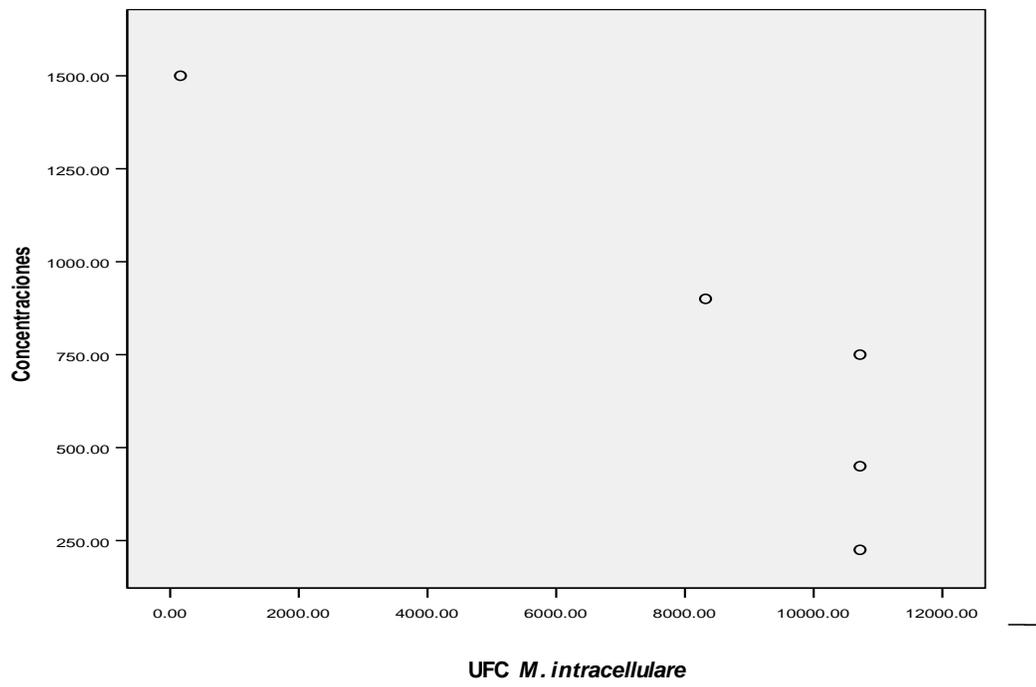


Figura 11 Número de UFC de *M. intracellulare* a las diferentes concentraciones durante 15 minutos.

7. DISCUSIÓN

Los desinfectantes se encargan de reducir el número de microorganismos a un nivel que no es peligroso para la salud, por ello los de alto nivel no necesariamente destruyen todas las micobacterias, esporas o priones (Hernández Rodríguez A. 2006). Como se puede observar en este trabajo, el ácido hipocloroso cumple con mencionado requisito en las pruebas realizadas en condiciones limpias (libres de materia orgánica o interferentes), ya que es 100% efectivo durante todos los intervalos de tiempo y a todas las concentraciones evaluadas para dichas pruebas, actuando a una concentración mínima de 225 ppm durante 5 minutos (Prueba de exposición directa al HClO y Portagérmenes).

Sin embargo se requiere de un desinfectante capaz de eliminar los microorganismos que puedan estar acompañados de componentes biológicos tales como proteínas, lípidos, células, entre otros, siendo de vital importancia probar el ácido hipocloroso en presencia de un agente orgánico como albúmina (interferente). En ésta prueba se encontró que la concentración mínima evaluada (225 ppm) en la exposición directa (condiciones limpias) debe ser aumentada a 1500 ppm para poder obtener una efectividad general al menos del 99,9% con cada una de las especies evaluadas en presencia de materia orgánica, ya que tanto *M. chelonae* como *M. intracellulare* mostraron elevada resistencia en esta prueba.

En adición, la prueba con interferente para *M. chelonae* y *M. fortuitum* evidencio que al aumentar el tiempo, en las concentraciones más altas (750, 900 y 1500 ppm), aumento también la efectividad del desinfectante hasta llegar a 100%, reduciéndose el número de UFC sobrevivientes, mientras que para *M. intracellulare*, el número de UFC sobrevivientes aunque se redujo se mantuvo mas alto con respecto a las otras dos especies aquí evaluadas.

Una diferencia relevante entre los resultados obtenidos en condiciones limpias y en condiciones con materia orgánica presente (condiciones sucias), puede ser explicada porque el HClO es un oxidante no selectivo que reacciona hábilmente con todas las biomoléculas, éste puede oxidar nucleótidos (Albrich, J. M., McCarthy, C. A. & Hurst, J. K. 1981), activar enzimas latentes (Weiss, S. J. Ortiz, G. P., Ragsdale, C. & Test, S. T. 1985), inactivar enzimas (Knox, W. E., Stumpf, P. K., Green, D. E. & Auerbach, V. H. 1948

& Clark, R. A. 1982) y sistemas de transporte de electrones (Albrich, J. M. & Hurst, J. K. 1982), romper membranas basales (Weiss, S. J. & Regiani, S. 1984) o membranas celulares (Slivka, A. LoBuglio, A. F. & Weiss, S. J. 1980 & Weiss, S. J. & Slivka, A. 1982) y fragmentar proteínas (Mckenna S & Davies K, 1988). Lo que sugiere una mayor cantidad de ácido hipocloroso para obtener una adecuada efectividad. Por otro lado es importante resaltar, que la cantidad de bacterias utilizadas en el inóculo real de este trabajo, probablemente intervino principalmente en los resultados esperados para esta prueba, ya que es superior a lo que se llegaría a encontrar en una muestra clínica.

Aunque se observa que la concentración de 1500 ppm puede ser efectiva en condiciones con materia orgánica presente en una superficie (prueba con interferente), la prueba estadística evidencia que entre los datos no existe ninguna diferencia significativa en algunas concentraciones; sin embargo es probable que dicho resultado sea producto del reducido número de replicas realizadas en este trabajo. Esto quiere decir que posiblemente, al hacerse más de dos replicas de los ensayos desarrollados en este trabajo puedan realizarse las pruebas estadísticas que demuestren una diferencia estadísticamente significativa necesaria para recomendar una concentración de uso de dicho desinfectante en “condiciones sucias”, lo mismo sucede con la correlación entre las variables.

Este desinfectante puede ser utilizado en condiciones libres de materia orgánica al menos por 5 minutos a una concentración de 225 ppm, aunque estas condiciones son las ideales no son las que se obtendrán en la realidad. Por lo tanto para uso comercial sería adecuado basarse en los resultados obtenidos en la prueba con interferente, la cual permite inferir que el desinfectante es efectivo a 1500 ppm durante 10 o 15 minutos, es importante tener en cuenta todas estas observaciones para recomendar el uso de este producto o cualquier otro, ya que es posible que las personas no sigan estrictamente las instrucciones de cada producto (Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002).

Con los resultados obtenidos, el ácido hipocloroso aún no puede recomendarse como desinfectante de alto nivel pero no se descarta que pueda serlo, ya que además de disminuir significativamente el número de especies de micobacterias (como *M. chelonae*,

M. fortuitum y *M. intracellulare*), tiene la capacidad de matar a microorganismos mas susceptibles a las esporas como las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Klebsiella pneumoniae* evaluadas en el 2003 por Henao S., Sierra C. & Gaitan J. No obstante de acuerdo a mencionados resultados se sugiere que este producto debe ser evaluado con cepas de aislados clínicos y comparar la efectividad obtenida con cepas ATCC (Herruzo-Cabrera R., Vizcaino MJ., Rodríguez J. 2006& Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002), ya que las cepas ATCC son adaptadas al laboratorio, y pueden no ser buenas predictoras de la susceptibilidad de cepas que producen infección (Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002).

En este trabajo se descarto la variable de temperatura de almacenamiento dado que en otros trabajos ha sido encontrado que para el ácido hipocloroso, ésta no influye en su efectividad (Henao S., Sierra C. & Gaitan J. 2003)

El número de unidades formadoras de colonias, varía entre las pruebas de condiciones limpias y sucias con respecto a la prueba de superficie y entre especies. La variación de UFC entre las pruebas puede ser por la diferencia en el volumen inicial del inóculo, es probable que la cantidad de bacterias adheridas a las limas de endodoncia sea mucho menor que la cantidad adicionada en las otras pruebas (exposición directa y con interferente), las cuales constan de 25 y 170 µl respectivamente.

8. CONCLUSIONES

El ácido hipocloroso es 100% efectivo en todos los intervalos de tiempo y a todas las concentraciones evaluadas en condiciones limpias, mientras que en condiciones sucias se ve limitada su efectividad solo a las más altas concentraciones (900 y 1500 ppm).

En la prueba de superficie el ácido hipocloroso inhibió el crecimiento de las micobacterias a la mínima concentración (225 ppm durante 5 minutos), obteniendo el mismo porcentaje de efectividad que en condiciones limpias (100%).

Se demostró que el ácido hipocloroso, al menos en las concentraciones evaluadas en este trabajo, no llega a ser tan efectivo como lo es el Cidex OPA. Sin embargo el ácido hipocloroso muestra ser un efectivo desinfectante en ausencia de materia orgánica.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la efectividad del ácido hipocloroso con cepas de micobacterias aisladas de muestras clínicas, teniendo en cuenta concentraciones y tiempo superiores y/o iguales a los efectivos encontrados en el presente trabajo, para posteriormente poder recomendar dicho producto como desinfectante de alto nivel, con mayor seguridad.

A demás se recomienda realizar mayor número de replicas por cada ensayo, ya que así se facilitaría la utilidad de las herramientas estadísticas al momento de establecer si hay o no una diferencia estadísticamente significativa o correlación entre variables.

10. AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

- * A mi familia y amigos.*
- * Alejandro Hernández por su enorme apoyo moral y académico.*
- * Sandra Milena Coronado, por su amistad, formación académica, consejos y recomendaciones.*
- * Profesores, compañeros de clase y administrativos del programa de Biología de la Universidad del Quindío.*
- * Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío*

11. BIBLIOGRAFÍA

Albrich, J.M., C.A. McCarthy, and J.K. Hurst. 1981. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:210–214.

Albrich J. M. and Hurst J. K. (1982) Oxidative inactivation of *Escherichia coli* by hypochlorous acid. *FEBS Lett.* 144, 157161.

Basso L. *et al.* 2005. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 100(6):575-606.

Bello T, Rivera I y de Waard J. 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24(5):319-21

Beran V *et al.*, 2006. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 51, 2006 (7): 365–389.

Bolan G, Reingold AL, Carson LA, Silcox VA, Woodley CL, Hayes PS, *et al.* 1985. Infections with *Mycobacterium chelonae* in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. *J Infect Dis.* 152:1013-9.

Caminero J.A. 2001. Micobacterias Atípicas. *BSCP Can Ped* 2001;25- n°2

Cardoso S., *et al.* 2004. Practical Handbook For The Phenotypic and Genotypic Identification of Mycobacteria.

Casal M. & Casal M. 2000. Las micobacterias atípicas como patógenos Emergentes. *Enf. Emerg.* 2(4):220-230

Chemlal K & Portaels F. 2003. Diagnosis of nontuberculous mycobacteria skin and soft tissue infection. 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

Chesney, J., J. W. Eaton, and J. R. Mahoney, Jr. 1996. Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine oxidants. *J. Bacteriol.* 178:2131–2135.

Clark, R. A. 1982. Modulation of the inflammatory response by the neutrophil myeloperoxidase system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 141, 207-214.

Cosma C, Sherman D & Ramakrishnan L. 2003. The Secret Lives Of The Pathogenic Mycobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 2003. 57

Cuesta G. 2004. Detección Y Caracterización por Métodos Fenotípicos y Moleculares de Mycolata Formadores de Espumas en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales Domésticas con Sistemas de Fangos Activos. Tesis doctorado en ciencias biológicas de la Universidad de Valencia Julio del 2004.

Crespo M, Corral R & Alzate A. 1997. Micobacterias no tuberculosas en personas VIH positivas y en personas sin factores de riesgo a la infección. Colombia Med 1997; 28.

Crespo MP, Corral RH, Alzate A, *et al.* 1994. El diagnóstico de la infección por micobacterias en individuos VIH positivos. Colombia Med 1994; 25: 86-91.

Dantec C *et al.* 2002. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. Applied And Environmental Microbiology, Nov. 2002, p. 5318–5325.

Del Solar *et al.* 2005. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura. Folia dermatol. Perú 2005; 16 (3): 127-135

García I., *et al.* 2002. Infección Cutánea por *Micobacterium chelonae*. Revisión de Seis Casos. Actas dermosifilogr 2002; 93 (10) 584 – 7.

Garzón L., *et al.* 2004. Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Editorial Esfera Editores Ltda.

Gómez R., *et al.* 2004. Infección Cutánea por *Micobacterium chelonae* en relación con la acupuntura. Med Clin (Barc) 2004; 122 (16): 636 – 9.

Harrison J. E. & Schultz J. 1976. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. J. Biol. Chem. 251: 1371-1374.

Henaó S., Sierra C. & Gaitan J. 2003. Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Universidad Nacional de Colombia Revista Facultad de Medicina 2003; 51(3): 136-142

Hernández Rodríguez A. 2006. Aportaciones al Estudio de la Actividad Antimicrobiana de los Antisépticos y Desinfectantes. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología.

Herrera M. 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova* 2004; 2 (2): 71-80.

Herruzo Cabrera R., Vizcaino Alcaide M.J., Fernández Aceñero M.J. 2004. The influence of laboratory adaptation on test strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*, in the evaluation of the antimicrobial efficacy of ortho-phthalaldehyde. *Journal of Hospital Infection* 57, 217–222.

Herruzo-Cabrera R., Vizcaino MJ., Rodríguez J. 2006. Comparison of the microbicidal efficacy on germ carriers of several tertiary amine compounds with ortho phthalaldehyde and Perasafe. *Journal of Hospital Infection* 63, 73-78

Horsburgh CR. 1991. Progression to disseminated infection in HIV infected persons colonized with micobacteria other than tuberculosis (MOTT). *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: L 279.

Knox W. E., Stumpf P. K., Green D. E., and Auerbach V. H. 1948. The Inhibition of Sulfhydryl. *J. Bacteriol.* 55: 451-458.

Liñan A., Rodríguez C., Barbarín J. & Huerta O. 2002. Análisis de riesgo Ambiental y su aplicación al almacenamiento y manejo de cloro industrial.

Luna C. 2001. Micobacterias Atípicas. *BSCP Can Ped* 2001; 25- nº 2

Mckenna S & Davies K, 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochem. J.* (1988) 254, 685-692.

Meyers H, Brown-Elliott BA, Moore D, Curry J, Truong C, Zhang Y, *et al.* 2002. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. *Clin Infect Dis.* 2002;1;34:1500 -7.

Molina R. & García O. 2003. Manual De Limpieza Y Desinfección Hospitalaria. Comité de Infecciones Intrahospitalarias.

Morris A. & Harrison A. 2003. Guidelines for Tuberculosis Control in New Zealand 2003 Chapter 19: Non-Tuberculosis Mycobacteria

Murillo J, Torres J, Bofill L, Ríos-Fabra A, Irausquin E, Isturiz R, *et al.* 2000. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. The Venezuelan Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. *Arch Dermatol.* 136:1347-52

Oriani, D.S. & Sagardoy, M.A. 2005. Susceptibilidad de *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium kansasii* frente a tres soluciones germicidas. *In Vet.* 7(1): 55-62

- Pérez L. 2000. Estrés Oxidativo: La Paradoja del Oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol* 11(3):139-42
- Primm T *et al.* 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, January 2004, p 98-106, Vol. 17, No 1.
- Rivera-Olivero IA, Guevara A, Escalona A, Oliver M, Pérez Alfonzo R, Piquero J, *et al.* 2006. Infecciones en tejidos blandos por micobacterias no tuberculosas secundarias a mesoterapia. ¿Cuánto vale la belleza?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:302-6.
- Trias J. 1994. Micobacterias. Porinas de la Pared Celular. *Investigación y Ciencia*, enero 1994 n°208.
- Totali, E. 2003. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2003, p. 319–354
- Sack JB. 1990. Disseminated infection due to *Mycobacterium fortuitum* in a patient with AIDS. *Rev Infec Dis* 1990; 5: 961-63.
- Schraufstatter, I. U., K. Browne, A. Harris, P. A. Hyslop, J. H. Jackson, O. Quehenberger, and C. G. Cochrane. 1990. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J. Clin. Invest.* 85:554–562.
- Slivka, A. LoBuglio, A. F. & Weiss, S. J. 1980. Potential role for hypochlorous acid in granulocyte-mediated tumor cell cytotoxicity. *Blood*, 55, 347-350.
- Solar M., Salomón M., Bravo F., Seas C., Gotuzzo E., Culqui D, Munayco C., Bolarte J., & Suárez L. 2005. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética. Reporte de casos y revisión de la literatura. *Folia dermatol. Peru* 16 (3): 127-135
- Wayne, L. G., & H. A. Sramek. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:1–25.
- Weiss S J, Slivka A. 1982. Monocyte and granulocyte-mediated tumor cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system. *J. Clin Invest* 69: 255-262.
- Weiss, S. J., & Regiani, S. (1984). Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor. Cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites. *J. Clin Invest*, 73, 1297-1303.
- Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C & Test ST (1985). Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, 227: 747-749.

Wenger JD, Spika JS, Smithwick RW, Pryor V, Dodson DW, Carden GA, Klontz KC. 1990. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection associated with use of jet injectors. JAMA.

Vizcaino M. J, Herruzo R. & Fernandez M. J. 2002. Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe and 2% glutaraldehyde in vitro tests. Journal of Hospital Infection Vol. 53.

Zaballos P., et al. 2002. Folliculitis Postdepilación por *Mycobacterium chelonae*. Actas dermosifilogr 2002; 93 (4): 259 – 62.