

## Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen  
Volume **44**

Número  
Number **4**




Enero-Marzo  
January-March **1999**

*Artículo:*




### Análisis de algunos indicadores biológicos disponibles comercialmente en México

Derechos reservados, Copyright © 1999:  
Asociación Dental Mexicana, AC

Otras secciones de  
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

# Análisis de algunos indicadores biológicos disponibles comercialmente en México

Dra. Luz María Parra-Pérez,\* Dr. Enrique Acosta-Gío\*

\* División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue comparar, mediante las pruebas descritas en la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, diversos indicadores biológicos (IB) contra las cepas de *Bacillus subtilis* 9372 y *B. stearothermophilus* 7953 del catálogo de la ATCC.

Se observó que las cepas ATCC y los IB provenientes de fabricantes extranjeros cumplen con las características morfológicas, bioquímicas y de cultivo estipuladas por la FEUM. De hecho, los fabricantes extranjeros establecen que sus productos están elaborados con las cepas ATCC.

Por el contrario, algunos IB de fabricación nacional no son elaborados con las cepas ATCC. El aislado de *B. subtilis*, para verificar la esterilización por calor seco, se comporta como la cepa ATCC-9372. Mientras que los indicadores para vapor a presión, supuestamente *B. stearothermophilus*, se comportan como *B. subtilis* sin pigmento.

El fabricante de IB deberá documentar la veracidad de sus afirmaciones y proporcionar información que permita al usuario la selección de productos adecuados. Las instrucciones de uso deberán ser precisas.

**Palabras clave:** Indicadores, biológicos.

## Abstract

*The aim of this investigation was to compare several biological indicators (BI) against Bacillus subtilis 9372 y B. stearothermophilus 7953 strains from the ATCC catalog, according to tests described in the Mexican Pharmacopoea (MP).*

*It was observed that ATCC strains and BI from foreign manufacturers have the morphological, biochemical and growth characteristics described in the MP. Indeed, foreign manufacturers claim that their products are elaborated with ATCC strains.*

*In contrast, some BI made in Mexico are not elaborated with ATCC strains. A Mexican B. subtilis isolate intended for use in dry heat actually behaves like ATCC-9372 strain, whereas another Mexican isolate used for verification of steam sterilization (supposedly B. stearothermophilus) behaves as a non pigmented B. subtilis.*

*BI manufacturers must document their claims truthfulness and provide information that will allow the end user to select adequate products. Instructions for use must be precise.*

**Key words:** Biologic, indicator.

## Introducción

La única estrategia que nos permite constatar el éxito de la esterilización, en forma práctica y económica, se basa en la selección de formas de vida microbiana alta-

mente resistentes a la esterilización.<sup>1</sup> La muerte de estos microorganismos nos indica la destrucción de patógenos menos resistentes, como *Mycobacterium tuberculosis* o los virus de la hepatitis B y de la inmunodeficiencia humana.

El uso de indicadores biológicos (IB) proporciona el único método, aceptado internacionalmente, para demostrar que logramos esterilizar el instrumental. Las fallas mecánicas de nuestros aparatos de esterilización y los errores del personal encargado de la esterilización, se hacen evidentes con la aplicación periódica de IB.

Los IB son endoesporas bacterianas con resistencias conocidas a los ciclos de esterilización. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)<sup>2</sup> establece que los IB deben cumplir con las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas de las cepas *Bacillus stearothermophilus* ATCC-7953 (para los ciclos de esterilización mediante vapor a presión) y *Bacillus subtilis* variedad *niger* ATCC-9372 (para los ciclos de esterilización mediante calor seco, u óxido de etileno).

Las siglas ATCC significan «American Type Culture Collection» y el número corresponde a su ubicación en el catálogo de esta colección de cultivos de referencia internacional.

En los Estados Unidos de Norteamérica, la Asociación Dental Americana (ADA),<sup>3</sup> los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés),<sup>4</sup> y la Organización para la Seguridad y la Asepsia en Consultorios (OSAP, por sus siglas en inglés)<sup>5</sup> recomiendan el uso semanal de IB. En México, la aplicación de los IB está contemplada en Normas Oficiales Mexicanas publicadas por la Secretaría de Salud (SSa)<sup>6</sup> y la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP).<sup>7</sup>

Existen IB diseñados para utilizar los servicios de un laboratorio externo, y también hay presentaciones concebidas para emplearse en aquellos consultorios que cuentan con un incubador ajustable a la temperatura requerida.

Diversos fabricantes y distribuidores venden IB en México. El objetivo de esta investigación fue comparar, mediante las pruebas descritas en la FEUM,<sup>2</sup> diversos indicadores biológicos (IB) contra las cepas de *Bacillus subtilis* 9372 y *B. stearothermophilus* 7953 del catálogo de la ATCC.

## Material y métodos

### Indicadores biológicos

Se emplearon IB disponibles en el comercio nacional. Las muestras fueron obtenidas de los fabricantes o de sus distribuidores en México. Todos los IB estaban en su empaque original y dentro de las fechas de caducidad.

Para la verificación de la esterilización mediante vapor a presión se evaluaron esporas de *B. stearothermophilus*, proporcionadas por Merck (A), Becton and Dickinson (B), Belsa (C), Raven (D), y MDT (E). Para la verificación de la esterilización mediante calor seco se

evaluaron esporas de *B. subtilis* proporcionadas por Belsa (F), y Raven (G).

Se emplearon, como estándar de referencia, *B. stearothermophilus* 7953 y *B. subtilis* 9372 adquiridos de la American Type Culture Collection (Manassas, Virginia).

### Incubación

Para la evaluación bacteriológica, *B. stearothermophilus* fue incubado a 57 °C y *B. subtilis* var. *niger* a 37 °C, según lo establece la FEUM.<sup>2</sup> Adicionalmente se hicieron pruebas de crecimiento a temperatura ambiente.

### Identificación macroscópica y microscópica

Los IB se sembraron en agar nutritivo (DIFCO, Michigan) y se incubaron durante 24 h. La morfología colonial se comparó con la de las cepas control, provenientes de la ATCC. La identificación microscópica se realizó, en frotis con tinción de Gram o con azul de algodón, bajo 10<sup>3</sup> aumentos.

### Cuantificación

Las endoesporas impregnadas en papel filtro fueron suspendidas en 10 mL de solución salina isotónica. En el caso de las esporas en suspensión se tomaron directamente 100 µL de la ampolleta. En ambos casos se obtuvieron diluciones seriadas hasta 10<sup>-6</sup>, y se sembró cada dilución por triplicado. Las muestras fueron dispersadas sobre el agar nutritivo con un rodillo de vidrio y después de 48 h se contó las unidades formadoras de colonias (UFC).

### Pruebas bioquímicas

**Catalasa.** Se utilizaron cultivos de 24 h de *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, sobre los cuales se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno. Se interpretó la reacción según la liberación de oxígeno.

**Crecimiento anaerobio.** *B. subtilis* o *B. stearothermophilus* se incubaron por 48 h en ausencia de oxígeno y se observó el desarrollo o ausencia de bacilos.

**Prueba Voges-Proskauer.** *B. subtilis* o *B. stearothermophilus* se colocaron en tubos con caldo RM/VP (DIFCO, Michigan). Después de 24 h de incubación, se agregó α-naftol, se dejó reaccionar por 5 min, y entonces se agregó 40% KOH. Después de 15 min se observó cambios cromáticos en las colonias.

**Hemólisis de Agar-Sangre.** Para la diferenciación de *B. subtilis* se sembraron los *Bacillus* en agar sangre. Después de 24 h de incubación, se observó el grado de hemólisis alrededor de las colonias.

**Hidrólisis de almidón.** Se sembró *B. subtilis* o *B. stearothermophilus* en agar almidón. Después de 24 h de incubación, se cubrió la superficie de las colonias con solución de lugol para evidenciar la hidrólisis del agar.

**Cuadro I.** Cuantificación de esporas en los indicadores biológicos.

Marca	Según el fabricante	Recuperadas en el laboratorio ( $\pm$ 1DE)
A	500,000-10,000,000	7,000,000 ( $\pm$ 1,700,000)
B	1,000,000	800,000 ( $\pm$ 200,000)
C	500,000-5,000,000	3,000,000 ( $\pm$ 860,000)
D	500,000-5,000,000	3,800,000 ( $\pm$ 900,000)
E	1,000,000	1,800,000 ( $\pm$ 470,000)
F	100,000	150,000 ( $\pm$ 50,000)
G	500,000	500,000 ( $\pm$ 460,000)

DE = desviación estándar.

**Resultados**

**IB disponibles en México**

Por lo menos seis compañías distribuyen y/o fabrican IB en México. Para la realización de este estudio, se utilizaron IB de cinco compañías.

Algunas marcas manejan la cantidad de endosporas dentro de un rango, mientras que otras proporcionan la concentración exacta, lo que refleja un mejor control de calidad en la elaboración del producto (*Cuadro I*).

El *cuadro II* muestra los resultados de la comparación bacteriológica.

*B. stearothermophilus*

La cepa ATCC-7953 mostró colonias circulares, con bordes bien definidos, de color crema y de superficie lisa. Los bacilos son Gram positivos y presentaron espora ovoide con ubicación subterminal. Estas mismas características las presentaron los IB de las marcas A, B, D y E.

Las endosporas de la ATCC-7953, y las de las marcas A, B, D y E presentaron crecimiento masivo a 57 °C. Su crecimiento fue menor a 37 °C.

Las esporas de la marca C se desarrollaron mejor a 37 °C y no crecieron a 57 °C, fueron positivas a la reacción

de Voges-Proskauer, y no mostraron diversas características de *B. stearothermophilus*.

Los *B. stearothermophilus* de las marcas A, B, D y E, al igual que las colonias ATCC-7953, fueron positivas a la reacción de la catalasa y al crecimiento anaerobio, y presentaron una reacción negativa a la prueba de Voges-Proskauer.

Esta especie de *Bacillus* creció como colonias blancas y opacas con bordes irregulares, pero no presenta pigmentación. Sus características microscópicas son similares a las de *B. subtilis*.

*B. stearothermophilus* es negativo a las pruebas de hemólisis y de hidrólisis.

*B. subtilis*

Las colonias de la ATCC-9372 mostraron bordes irregulares y superficie lisa con pigmentación negra. Al microscopio, son bacilos Gram positivos con espora esférico de ubicación central. Los cultivos de la ATCC-9372 y las marcas F y G presentaron un crecimiento masivo a 37 °C y no se desarrollaron a 57 °C. Los cultivos ATCC-9372 fueron positivos a la prueba de la catalasa, a la reacción de Voges-Proskauer, al crecimiento anaerobio, a la hemólisis y a la hidrólisis de almidón. Las marcas F y G cumplieron con los resultados anteriores.

**Discusión**

Los resultados de este análisis demuestran que no todos los IB, comercialmente disponibles en México, muestran las características morfológicas, de cultivo y bioquímicas de las cepas de *Bacillus* estipuladas en la FEUM.

Se comprobó que los IB, para vapor a presión (*B. stearothermophilus*) de las marcas A, B, D y E contienen endosporas con características propias de la cepa ATCC-7953. De hecho, estos fabricantes establecen en la etiqueta que su IB está elaborado con la cepa 7953 de la ATCC.

**Cuadro II.** Caracterización de los indicadores biológicos.

	<i>B. stearothermophilus</i> , para vapor a presión						<i>B. subtilis</i> , para calor seco		
	7953	A	B	C	D	E	9372	F	G
Pigmento	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Crecimiento a 57 °C	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+++	+	+	+++	+++	+++
Catalasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Hemólisis	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Hidrólisis del almidón	-	-	-	+	-	-	+	+	+

El IB de la marca C, para vapor a presión (supuestamente *B. stearothermophilus*) presentó una morfología diferente a la cepa ATCC-7953, y en las pruebas bioquímicas resultó similar a *B. subtilis*, pero no de la variedad niger, por su falta de pigmentación.

Los IB para calor seco u óxido de etileno, de las marcas F y G mostraron características compatibles con *B. subtilis* ATCC-9372. De hecho el fabricante de la marca G establece que su IB para calor seco esta elaborado con endoesporas provenientes de la ATCC.

El profesional interesado en aplicar los indicadores biológicos a sus ciclos de esterilización puede encontrar ventajas y desventajas inherentes a las diversas presentaciones. Existen indicadores biológicos diseñados para utilizar los servicios de un laboratorio externo, y también hay presentaciones concebidas para emplearse en aquellos consultorios que cuentan con un incubador ajustable a la temperatura requerida.

Algunos distribuidores sugieren la incubación de los IB a «temperatura ambiente» dentro del consultorio dental. Sin embargo, los resultados mostraron que la temperatura de incubación no puede ser arbitraria.

Las endosporas de *B. subtilis*, de todas las marcas incluyendo las cepas de la ATCC, se desarrollan poco a 20 °C, y *B. stearothermophilus* no presenta crecimiento a 20 °C. En contraste, bajo condiciones controladas, *B. subtilis* ATCC-9372 crece bien a 37 °C, y *B. stearothermophilus* ATCC- 7953 muestra crecimiento óptimo sólo a 57 °C.

Además, la recomendación de «incubar» los IB a «temperatura ambiente» es errónea, pues diversos factores afectan la temperatura en una habitación, entre ellos, la ventilación y la orientación del cuarto, la proximidad de equipos que producen calor o el uso de aire acondicionado, la hora del día, la diversidad de climas, la altitud y humedad de la localidad, la zona geográfica, la estación del año. Por ello, resulta evidente que la «incubación» a «temperatura ambiente» no es confiable.

Es importante vigilar la calidad de los IB disponibles comercialmente, pues no todos los fabricantes emplean las cepas provenientes de la ATCC. También, conviene confirmar la veracidad en las declaraciones de quienes los ofrecen.

La FEUM<sup>2</sup> establece que «cuando un IB es utilizado fuera de las indicaciones y recomendaciones de uso, la verificación mínima de sus parámetros de resistencia sería insuficiente, por lo que deberá validarse para los propósitos reales de uso y para las condiciones en las cuales se va a aplicar».

## Conclusiones

El usuario se beneficia de la diversidad de productos disponibles comercialmente. Pero debe vigilar la calidad de

los productos que le ofrecen y la confiabilidad de las aseveraciones del vendedor.

Es necesario que el usuario tenga conocimiento sobre las características de las endoesporas utilizadas como IB, así como de los requisitos que deben de cumplir.

Las pruebas de laboratorio aplicadas a los indicadores biológicos deben coincidir con lo establecido en la FEUM y no estar basadas en lo sugerido por el fabricante, ya que los resultados aparentemente favorables pueden ocultar limitaciones del producto.

**Nota y agradecimiento.** Este laboratorio pone a la disposición de los interesados muestras de los lotes empleados en este estudio. Agradecemos a las compañías Merck y Belsa por donarnos muestras de sus productos. Especialistas en Esterilización y Envase, S.A. de C.V. declinó participar en este estudio

## Bibliografía

1. Miller CH. Sterilization: disciplined microbial control. *Dent Clin North Am* 1991; 35: 335-339.
2. Métodos generales de análisis. En: *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Sexta Edición. Secretaría de Salud, México D.F. 1994: 165-172.
3. American Dental Association: Council on Dental Materials, Instruments and Equipment; Council on Dental Practice; and Council on Dental Therapeutics. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory. *JADA* 1992; (suppl).
4. Centers for Disease Control and Prevention. Recommended infection-control practices for dentistry, 1993. *MMWR* 1993; 41(RR-8): 1-12.
5. Office Sterilization and Asepsis Procedures Research Foundation. *Infection control in dentistry guidelines*. Annapolis Maryland. 1995.
6. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994 «Para La Prevención de Enfermedades Bucales», Secretaría de Salud. *Diario Oficial de la Federación*, Enero 21, 1999.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 «Separación, Envasado, Almacenamiento, Recolección, Transporte, Tratamiento y Disposición Final de los Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos que se Generan en Establecimientos que presten Atención Médica». Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. *Diario Oficial de la Federación*, Noviembre 7, 1995.

Reimpresos:

Dr. Enrique Acosta-Gío.

Apartado Postal 70-421

Ciudad Universitaria

04510 México D.F.

Teléfono: (5) 622-5564

E-mail: acostag@servidor.unam.mx