

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTISEPTICOS USADOS A NIVEL
HOSPITALARIO FRENTE A CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE INTERES
CLINICO.**

RUBEN CARDENAS

MAIRA VALOYES

Director

LIBARDO HERNANDEZ

Codirector

JANETH ARIAS

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

BACTERIOLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y BACTERIOLOGIA
BOGOTÁ, D.C.
2012**

**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTISEPTICOS USADOS A NIVEL
HOSPITALARIO FRENTE A CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE INTERES
CLINICO.**

Presentado por

RUBEN CARDENAS

MAIRA VALOYES

APROBADO

Janeth del Carmen Arias, Bacterióloga
Director

Libardo Hernández, Químico Farmacéutico
Codirector

Alba Alicia Trespalacios
Par Evaluador

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo 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”.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTISEPTICOS USADOS A NIVEL HOSPITALARIO FRENTE A CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE INTERES CLINICO.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de antisépticos frente a bacterias sensibles y resistentes a antibióticos. Para esto se evaluaron 4 cepas resistentes a antibióticos: *Escherichia coli* BLEES ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* SARM Comunidad HUSI 773590, *Pseudomonas Aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae* KPC y 4 cepas sensibles a los antibióticos: *Escherichia coli* 259224, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592423, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 300053, frente a 4 antisépticos denominados E, I, H, J. Se hicieron curvas de crecimiento para determinar su fase exponencial. De cada cepa aislada se preparó un inóculo con una concentración de 3×10^8 cel /ml correspondiente al patrón número 1 de Macfarland; A partir de este, se tomaron 8ml de los antisépticos y se le adicionaron 2ml de inóculo en los siguientes tiempos de contacto (0, 5, 10, 20, 40, y 80 segundos), por triplicado. De cada replica se tomaron 2ml y se llevaron a 8ml de caldo neutralizante Leethen. Los resultados mostraron que todos los antisépticos presentaron actividad frente a las 4 bacterias. El producto H, presentó la mejor actividad con un tiempo mínimo de 5 segundos frente a las cepas sensibles y resistentes, el producto J fue el que menor actividad presentó con un tiempo mayor a 80 segundos en 3 de las 8 cepas evaluadas. Para las bacterias resistentes el producto E presentó un porcentaje de inhibición del 100% a los 80 segundos para todas las cepas a excepción de *S. aureus*, y el producto I a los 40 segundos inhibió a todas las cepas sensibles y resistentes. Los antisépticos ejercieron una actividad inhibitoria frente a todas las cepas evaluadas; las bacterias sensibles presentaron mayor inhibición que las resistentes, siendo el producto H eficiente tanto para las sensibles como las resistentes con un tiempo de acción de 5 segundos. La bacteria más rápidamente inhibida fue *Pseudomonas aeruginosa* y la más resistente fue *Staphylococcus aureus* tanto sensible como resistente. *Klebsiella pneumoniae* fue la que mejor se inhibió frente a todos los productos para los dos casos.

PALABRAS CLAVE: Antisépticos, Antibióticos, Infecciones nosocomiales, Efecto microbicida, Efecto Microbiostático.

INTRODUCCION

Las infecciones intrahospitalarias ocurren en todo el mundo. Estas se encuentran entre las principales causas de muerte y aumento de la morbilidad entre los pacientes hospitalizados por lo tanto son un importante problema tanto para el paciente como para la salud pública. (1)

Las infecciones que se adquieren dentro de un hospital son consecuencia del tipo de atención médica que reciben los pacientes y representan un problema de extraordinaria gravedad. Los informes que se publican en todo el mundo muestran que entre el 5 y 10% de los enfermos que se hospitalizan, adquieren por lo menos un episodio de infección durante su estancia en las entidades prestadoras de servicio de salud (2). Estas infecciones contribuyen a una inadecuada calidad de la atención médica, ya que la principal expectativa de un enfermo al recibir cuidados médicos es la solución de sus problemas de salud. (2)

Las crecientes preocupaciones sobre la posibilidad de contaminación microbiana y los riesgos de infección en los centros de salud, mercados de alimentos y en general de los consumidores, también ha conducido a un aumento del uso de antisépticos por el

público en general. La desinfección de las manos y antebrazos ha sido una estrategia esencial para prevenir las infecciones transmitidas en los centros médicos, por parte del personal hospitalario, pero para que haya una actividad antimicrobiana adecuada, los antisépticos están obligados a cumplir con una acción eficaz para prevenir la propagación de patógenos (3)

Muchas bacterias sensibles y resistentes son frecuentemente aisladas de los centros de salud. Pero algunas en particular presentan una alta incidencia, por lo tanto es de gran importancia la búsqueda de mecanismos para su eliminación.

La prevalencia de resistencia a los antibióticos de amplio espectro, (BLEE) que produce *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se ha incrementado notablemente en los últimos años. Estas generan un impacto significativo en los hospitales, creando esfuerzos para controlar los brotes de infección, se controla el uso de los antibióticos, así como precauciones de barrera para reducir su propagación. (4)

Staphylococcus aureus es un importante patógeno humano, algunos resistentes especialmente a la Meticilina. Es causante de infecciones de origen nosocomial, en mayor proporción en pacientes inmunocomprometidos. (5)

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* coloniza predominantemente quemaduras y heridas quirúrgicas. Es naturalmente resistente a muchos antibióticos y tiene una notable capacidad para la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia bajo presiones selectivas de los antibióticos (6)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado directrices de control de infecciones que pueden ser una valiosa guía para el personal de control de infecciones y otros trabajadores de salud involucrados en el cuidado de los pacientes. Una de las estrategias para prevenir la aparición de las infecciones a nivel hospitalarios es la utilización de antisépticos, en los cuales se busca bajo costo, amplio espectro de acción, y tiempos de acción no superiores a los 3 minutos y otros con mayor eficacia entre 10 a 30 segundos. (7)

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de antisépticos frente a bacterias sensibles y resistentes a antibióticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA- JUSTIFICACION

En la última década, los requisitos relativos a la actividad antimicrobiana de los desinfectantes en el campo de la medicina se ha definido en diversas normas Europeas. Sin embargo, las normas equivalentes sobre antisépticos siguen faltando. Como resultado, una variedad de productos está disponible en el mercado con moderada acción antimicrobiana o incluso insuficiente. Por lo tanto es muy difícil para el clínico identificar las diferencias entre los antisépticos disponibles en el mercado y decidir que producto es más beneficioso. (8)

La resistencia bacteriana, está fuertemente asociada a las infecciones intrahospitalarias. Es una propiedad natural, cromosómicamente controlada de una célula bacteriana que le permite eludir la acción de un antiséptico o desinfectante. Este problema obliga a las autoridades de salud a buscar estrategias para reducir el riesgo de infección o colonización bacteriana y convertir los instrumentos en materiales seguros para su uso en pacientes, así como de agentes antibacterianos eficaces para eliminar estos agentes (4). A pesar de los avances en la salud pública y la atención

hospitalaria, las infecciones continúan desarrollándose en pacientes hospitalizados, así como el aumento de la probabilidad de complicaciones e incluso la muerte a causa de estas (2). El aumento de la duración de la estancia para los pacientes infectados contribuye en gran medida a los costos a nivel clínico pues no sólo se aumentan los costos directos a los pacientes o los pagadores, sino también los costos indirectos debido a la incapacidad; el aumento del uso de medicamentos, la necesidad de aislamiento, el uso de laboratorios adicionales y otros estudios de diagnóstico que contribuyen a los mismos. (2)

Un estudio realizado por la OMS mostró que el aumento global en la duración de la hospitalización para los pacientes con infecciones de heridas quirúrgicas fue de 8,2 días, que van de 3 días para ginecología 9,9 para cirugía general y ortopédica de 19,8.(2)

Las Infecciones intrahospitalarias son un indicador que mide la calidad de los servicios. Actualmente la eficiencia de un hospital no solo se mide por los índices de mortalidad y aprovechamiento del recurso cama, sino también se toma en cuenta el índice de infecciones hospitalarias (5). No se considera eficiente un hospital que tiene una alta incidencia de infecciones adquiridas durante la estadía de los pacientes en él, ya que lo primero que no debe hacer un hospital es enfermar. Por lo tanto, es imperante encontrar medidas que permitan reducir o eliminar los patógenos que están altamente asociados con estas infecciones.

El proceso de antisepsia juega un papel importante en la disminución de la carga microbiana con lo cual se mejora la eficiencia en el control de las infecciones, se disminuye su frecuencia y costos de operación, evitando, por lo tanto, gastos innecesarios para la institución que presta el servicio salud, pero sobre todo, contribuyendo al mejoramiento de la calidad médica y seguridad del paciente.

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la actividad de antisépticos frente bacterias sensibles y resistentes a antibióticos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Determinar el tiempo de acción de antisépticos frente a bacterias sensibles y resistentes a antibióticos.
- ❖ Determinar el porcentaje de inhibición de cada producto frente a cepas sensibles y resistentes.
- ❖ Comparar los porcentajes de inhibición de cepas sensibles y resistentes frente a antisépticos.

MARCO TEORICO

El uso de agentes químicos como antisépticos y desinfectantes es la principal medida de control utilizada a nivel clínico para disminuir el riesgo de infección intrahospitalaria. (8) La contaminación de las manos del personal de salud con los microorganismos resistentes a antibióticos, juega un papel importante en la epidemiología de las infecciones nosocomiales. El lavado de manos es generalmente aceptado como el método más eficaz para prevenir la propagación de patógenos,

sobre todo en el campo preoperatorio donde es fundamental contar con altos niveles de asepsia. Muchos agentes antisépticos están disponibles comercialmente, sin embargo, hay limitadas formas de estudiar la eficacia de estos agentes en la piel (9). Una variedad de ensayos para evaluar la actividad de los antisépticos han sido reportados. Principalmente existen dos: pruebas *in vivo* y *in vitro*. La prueba de lavado de manos es un ejemplo de las pruebas *in vivo*, así como la prueba del antebrazo. Estas pruebas presentan múltiples limitaciones pues reflejan la total reducción de los microorganismos que se encuentran naturalmente en la piel, y no de los microorganismos adquiridos o transferibles en el hospital, además, esta puede estar determinada por la técnica del lavado de manos en lugar de verdadera eficacia del producto. (9)

Para las pruebas *in vitro*, los procedimientos más utilizados son los tests cuantitativos con microorganismos en suspensión, y entre ellos el método de dilución-neutralización, que es uno de los procedimientos del tipo *in vitro* más utilizados en la valoración de la actividad de un antiséptico o desinfectante y función de eliminación de microorganismos patógenos. En este ensayo es utilizado un neutralizante encargado de frenar la reacción, y en las que La CMB es la mínima concentración de antiséptico o desinfectante ensayada capaz de reducir en 5 unidades logarítmicas (10^5 UFC/ml) una suspensión de bacterias en 5 minutos de contacto con el desinfectante a 20 °C.(10)

Muchos biocidas pueden ser químicamente inactivados. Varios neutralizantes y medios de cultivo de dilución han sido formulados para este fin. Dentro de los más conocidos se encuentra el caldo Letheen y Thioglicolato para inactivar el desinfectante. La eficacia de los neutralizantes fue originalmente demostrada con *Staphylococcus aureus* y posteriormente con una variedad de microorganismos. El caldo Letheen es efectivo en la recuperación de bacterias expuestas a compuestos de amonio cuaternario y biguanidas (11)

Este medio de cultivo, tiene la capacidad de neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soya, que además de aportar nutrientes al medio de cultivo, actúa como agente emulsificante y neutraliza compuestos de amonio cuaternario. El agregado de Tween 20 o Tween 80, es útil para neutralizar compuestos tales como fenol, formalina, hexaclorofeno, y la combinación de la lecitina con el Tween, permiten neutralizar el etanol. A pesar de su toxicidad, su uso es conveniente debido a que no interfiere con el metabolismo de los microorganismos y además porque son de acción rápida. (11)

Los antisépticos son agentes microbicidas que pueden aplicarse sobre la piel y mucosas pero no pueden ser utilizados internamente, son ejemplos de ellos: los agentes mercuriales, nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes, detergentes (12). Estos deben cumplir con ciertas características que lo hacen ideal a la hora de su uso. Entre ellas están:

Actividad antimicrobiana. Debe ser capaz de matar a los microorganismos. A baja concentración debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Gram positivas, Gram negativas, micobacterias), virus, hongos, esporas.

Solubilidad. Debe ser soluble en agua u otros solventes, en la proporción necesaria, para su uso efectivo.

Estabilidad. Durante el almacenamiento los cambios en sus propiedades deben ser mínimos y no deben causar una pérdida significativa de su acción germicida.

No debe ser tóxico para el hombre ni los animales. (12)

Debe ser tóxico para los microorganismos a la temperatura ambiente, para que al usar el agente no sea necesario elevar la temperatura más allá de la que se encuentra normalmente en el lugar donde se va a utilizar.

Capacidad para penetrar. Esto no es necesario si se requiere sólo una acción superficial.

Idealmente el desinfectante debe ser inodoro o tener un olor agradable.

Capacidad detergente: limpieza y desinfección: la acción limpiadora mejora la efectividad del desinfectante

Económico (buena relación coste/eficacia)

No causarle efectos nocivos para el medio ambiente

No inducir ni desarrollar resistencia (12)

No existe en el mercado un antiséptico que cumpla todas estas características. Se escoge uno u otro en función del tipo de microorganismos que se desee eliminar y factores ambientales como, la temperatura, el pH de trabajo, humedad y otros como el tiempo de actuación, la presencia de materia orgánica etc.

A los antisépticos se los suele clasificar tomando en cuenta simultáneamente su estructura química y su mecanismo de acción.

Ácidos yodados: Son los germicidas más activos in vivo. Su amplio espectro abarca bacterias de todos los grupos, hongos, virus e incluso esporas. Su efecto se debe a la yodación de proteínas vitales para los microorganismos (altera su estructura proteica y los ácidos nucleicos). Su acción está limitada por la inactivación por sangre y otros materiales biológicos. Generalmente han sido utilizados tanto para desinfectar piel intacta como para decontaminar heridas pequeñas. La forma más utilizada es en soluciones yodadas (principalmente iodo-ioduro de potasio en alcohol). (13)

Iodóforos

Un iodóforo: es un agente solubilizante o portador del yodo con el que se combina en forma reversible es rápidamente bactericida, fungicida, tuberculocida, virucida, esporicida. El complejo resultante provee un reservorio de liberación sostenida de yodo libre en solución acuosa (libera iodo lentamente). Son de mayor sustentividad que las soluciones iodo-ioduradas. Los más empleados son:

Iodopovidona (polivinilpirrolidona yodada): es la droga de elección para la antisepsis quirúrgica incluyendo inyecciones y cateterizaciones. Debe emplearse en soluciones al 10% para asegurar una concentración en iodo libre igual o superior al 1%. En soluciones jabonosas o como jabón sólido es útil para limpieza de manos y para limpieza prequirúrgica de la piel.

Iodoformo: químicamente es el equivalente yodado del cloroformo; muy utilizado en odontología.

Cadexómero yodado: iodo incorporado a un polisacárido reticular.

Alcoholes

Los alcoholes han demostrado ser eficaces antimicrobianos. Algunos de ellos: alcohol etílico (etanol, alcohol), alcohol isopropílico (isopropanol, propan-2-ol) y n-propanol (en particular en Europa) son los más utilizados. Los alcoholes presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias vegetativas (incluyendo micobacterias), virus y hongos, pero no son esporicidas. Sin embargo, se sabe que

inhibe la esporulación y la germinación de las esporas, pero este efecto es reversible debido a la falta de actividad esporicida, los alcoholes no son recomendados para la esterilización, pero son ampliamente utilizados para desinfección y antisepsia de la piel. Su efectividad es rápida pero de corta duración porque tiende a evaporarse y para el tratamiento de heridas superficiales es limitada. Para el lavado de manos tiene una eficacia similar a la de los jabones. Puede potenciar la acción de otros antisépticos para los que se utiliza como solvente. Su volatilidad le otorga escasa sustentividad y se hace difícil obtener un tiempo de contacto adecuado (13)

Timerosal

Es el más utilizado de los antisépticos mercuriales. Su actividad es del tipo bacteriostática, más marcada sobre bacterias Gram positivas, con nula o escasa actividad sobre otros microorganismos. Su efecto se debe a una inhibición enzimática con grupos sulfhidrilos y es una droga de baja actividad. Su eficacia aún no ha demostrado ser superior a la del solvente hidroalcohólico en que se encuentra diluido. Es muy utilizado como conservador de soluciones tópicas. Debe ser conservado al en oscuridad y el tiempo que debe dejarse transcurrir después de su aplicación es de 30 minutos en mucosas o 5 minutos en piel. (13)

Detergentes

Un detergente es una sustancia que disminuye la tensión superficial permitiendo la emulsión de sus lípidos solubilizándolos en agua, lo que facilita su remoción. Los detergentes aniónicos se denominan jabones y se utilizan fundamentalmente para limpieza de la piel y superficies de los ámbitos en que se desarrolla la atención clínica o quirúrgica de pacientes. Los detergentes catiónicos son un grupo numeroso de fármacos de actividad variable, cuyo uso más importante es en la limpieza de la piel antes de la aplicación de otros antisépticos (13)

Clorexidina

La Clorhexidina es probablemente el más ampliamente biocida utilizado en productos antisépticos, en particular en productos de lavado de manos y oral, pero también como un desinfectante y conservante. Esto se debe en particular a su eficacia de amplio espectro, sustentividad para la piel, y baja irritación. A pesar de las ventajas su actividad es dependiente del pH y se reduce considerablemente en presencia de materia orgánica. (13)

Dependiendo de cómo se manipulen, el éxito logrado con los antisépticos, variará desde una inactivación mínima del microorganismo a tratar, hasta una condición casi completa de esterilidad.

METODOLOGIA

Se utilizo un diseño experimental mediante el cual se evaluó la actividad de cuatro productos (muestras ciegas) E, H, I y J antisépticos a concentraciones desconocidas, con las siguientes cepas:

CEPAS

Cepas resistentes

Las cepas *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* SARM Comunidad HUSI 773590 fueron aisladas del Hospital Universitario San Ignacio y conservadas en el Cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. La cepa *Escherichia coli* BLEES es una cepa ATCC 25922 conservada y obtenida del Cepario de la Pontificia Universidad Javeriana.

Cepas sensibles

Klebsiella pneumoniae ATCC 300053, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592423, y *Escherichia coli* ATCC 25922.

CONFIRMACION DE LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Primero se realizaron pruebas de la pureza de las cepas por medio de coloración de Gram, y después, antibiogramas mediante el método de difusión de disco Kirby-Bauer en Agar Mueller Hinton (14) para cada una de las cepas con los siguientes antibióticos:

E. coli ATCC 25922: Ceftazidima (30 μ g), Cefotaxima (30 μ g), Ceftriazona (30 μ g), Aztreonam

S. aureus SARM: Comunidad HUSI 773590: Clindamicina (2 μ g), Ciprofloxacina (5 μ g), Meticilina(5 μ g), Oxacilina(1 μ g), Cefoxitin(30 μ g) (ver anexos)

Pseudomonas aeruginosa: Cefoperaxona (30 μ g), Imipenem (10 μ g), Ciprofloxacina (5 μ g)

Klebsiella pneumoniae KPC : Meropenem(10 μ g)

Los microorganismos aislados se inocularon en Agar Muller Hinton y sobre la superficie de este se colocaron los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C. Se valoró el diámetro de la zona de inhibición que se formó alrededor de cada disco y se comparó con las referencias publicadas por el CLSI. De esta manera se determinó la resistencia a cada uno de los antibióticos. (14)

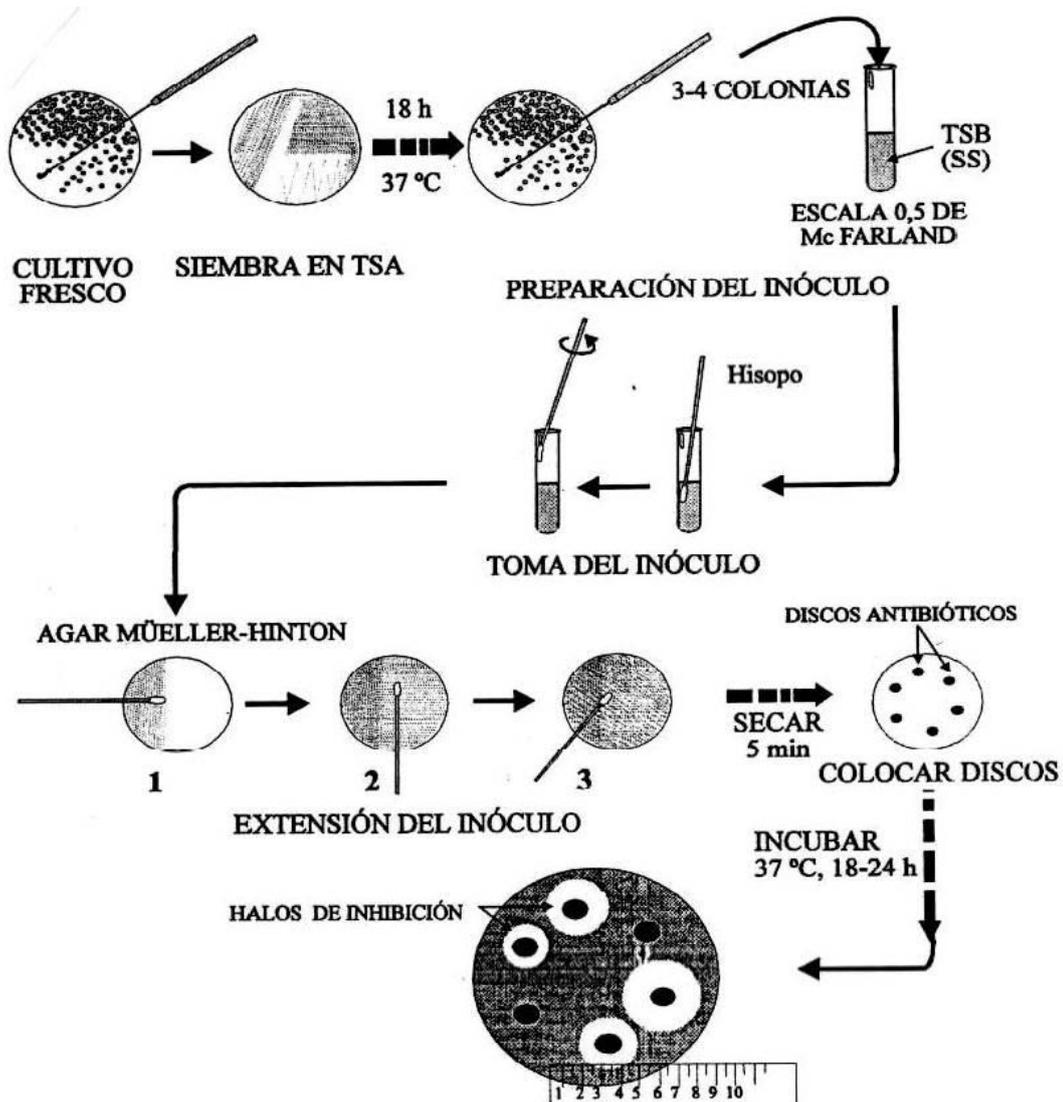


Figura 1. Metodología Difusión en Agar Kirby-Bauer(15)

CURVAS DE CRECIMIENTO

A partir de un cultivo aislado con los microorganismos se preparó una suspensión en 10ml de solución salina con una concentración de 3×10^8 células /ml correspondiente al patrón numero 1 de Macfarland, y se agregaron a 90ml de caldo TSA. En un erlenmeyer de 200 ml con 90 ml de caldo TSA, se inocularon 10 mL del preinoculo de las cuatro cepas y se incubaron a 37°C a 150 rpm en 10 tiempos diferentes (0,2,4,6,8,10,12,14,18 horas) por triplicado. Finalmente se verificó la pureza del cultivo por coloración de Gram.

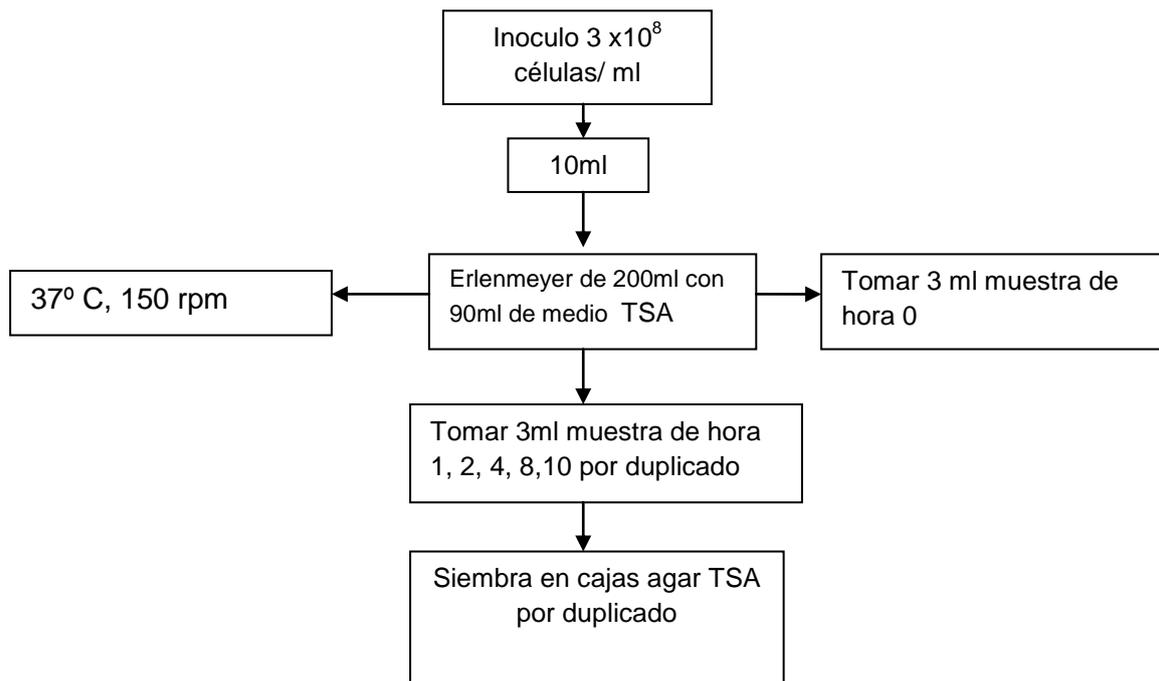


Figura 2. Metodología curva de crecimiento

VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTISEPTICOS DE CEPAS RESISTENTES A ANTIBIOTICOS ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN

A partir del cultivo de trabajo de cada microorganismo, se realizó una suspensión de 10ml en solución salina, con una concentración cercana a 3×10^8 células / ml, y esta se inoculó en 90ml de caldo TSA. Por otra parte se agregaron 8ml de cada uno de las (soluciones E, H, I, J); a estos se le adicionaron 2ml de la suspensión con los microorganismos a los tiempos 0, 5, 10, 20, 40, 80 segundos. A partir de estos se tomaron 2 ml y se neutralizó agregando 8 ml de caldo Letheen. (16)

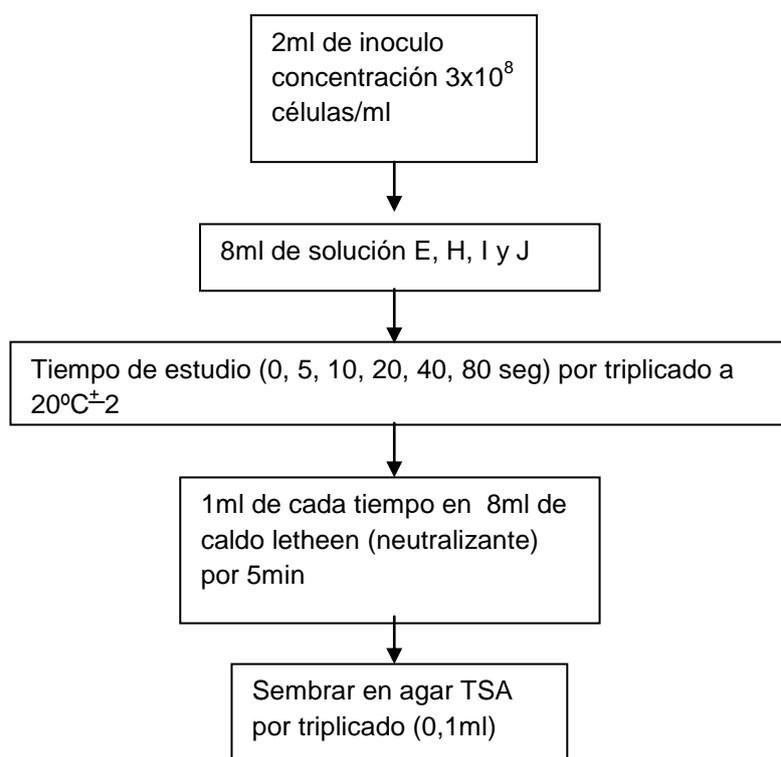


Figura 3. Valoración de la actividad de los antisépticos a cepas sensibles y resistentes a antibióticos ensayo de neutralización

RESULTADOS Y DISCUSION

Las bacterias enfrentan condiciones que limitan o impiden constantemente su crecimiento. Su habilidad para colonizar un ambiente requiere la capacidad para alternar periodos de rápida división celular y de crecimiento nulo. Las características de las células en estos periodos pueden analizarse en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y composición del medio de cultivo.

La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: fase adaptación fase logarítmica o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. (17)

CURVA DE CRECIMIENTO *E. coli* BLEES

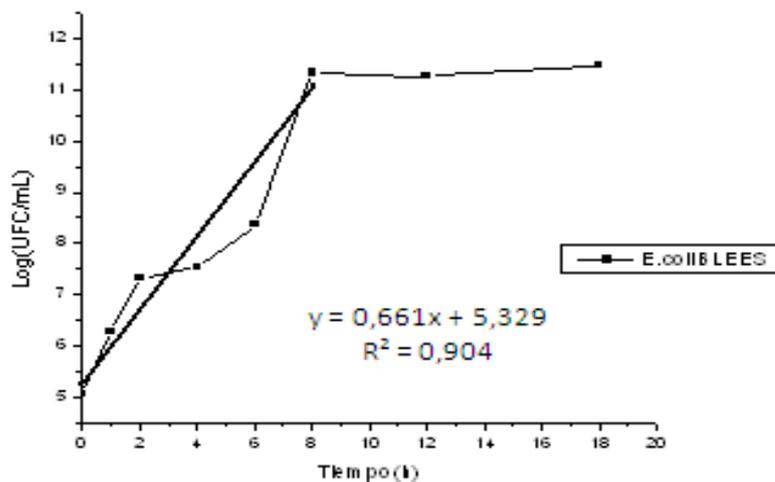


Figura 4. Curva de crecimiento de *E. coli* BLEES a lo largo del tiempo.

CURVA DE CRECIMIENTO *Staphylococcus aureus* SARM

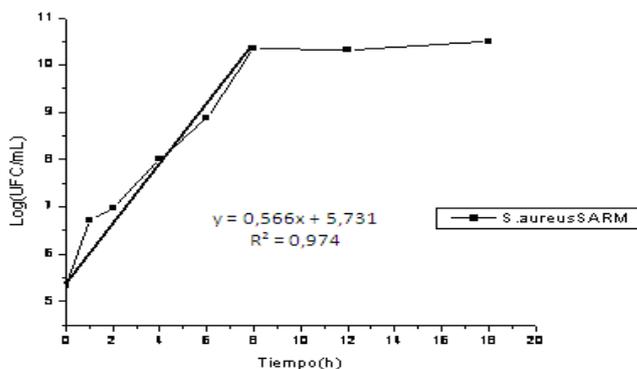


Figura 5. Curva de crecimiento *S. aureus* SARM a lo largo del tiempo.

CURVA DE CRECIMIENTO *Klebsiella pneumoniae*

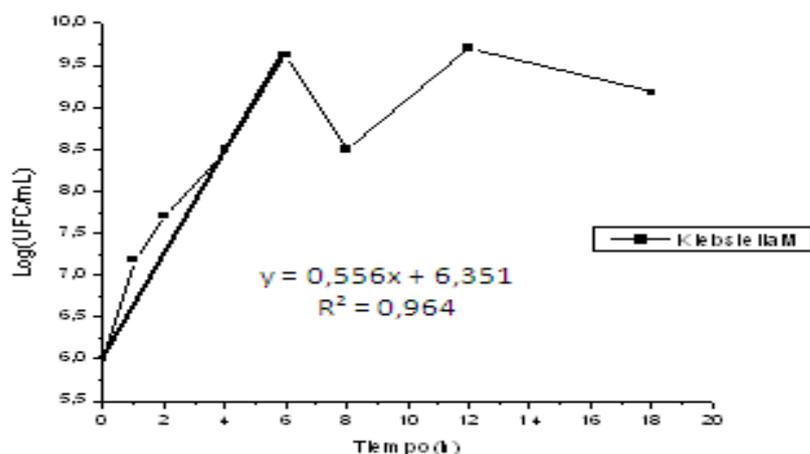


Figura 6. Curva de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* a lo largo del tiempo

CURVA DE CRECIMIENTO *Pseudomonas aeruginosa*

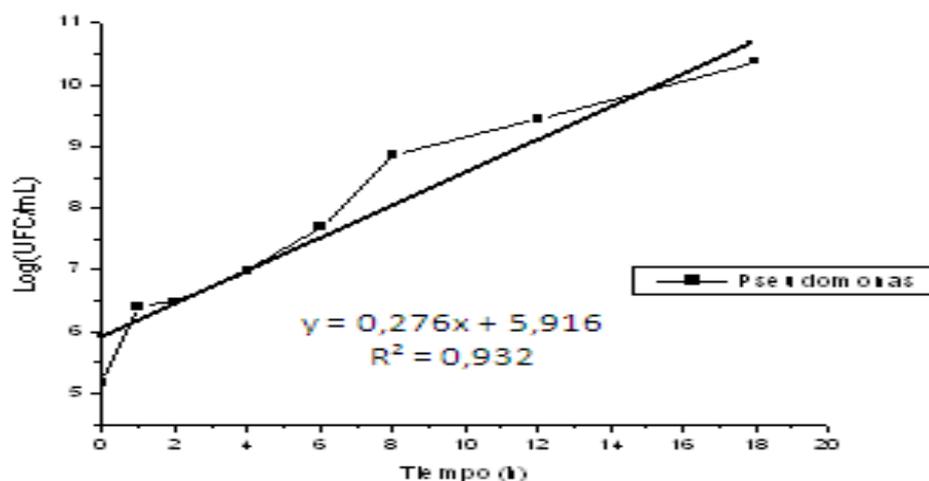


Figura 7. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a lo largo del tiempo.

Como se puede observar en la figura 1, *E coli* evidencia crecimiento desde las 0 hasta las 6 horas. Este comportamiento es coherente con los reportes de Ramírez Santos y colaboradores en el 2005. De igual forma *K. pneumonie* se adaptó rápidamente al medio y comenzó su fase de crecimiento desde la hora 0, terminando en la hora 6; presentó un ascenso en su crecimiento luego de la hora 8 y hasta la 12, esto indica que este microorganismo pudo presentar un fenómeno denominado diauxia lo que

hace posible que existan dos fuentes de carbono asimilables por el microorganismo y que se adapte al segundo después de haberse agotado el primero para obtener un mayor rendimiento energético.(ver figura 6).(18).

Respecto a *P.aeruginosa* presenta un crecimiento exponencial hasta la hora 18 no muy diferente a los estudios realizados por *L.S. Englad. 2003* (19). (Ver figura 7)

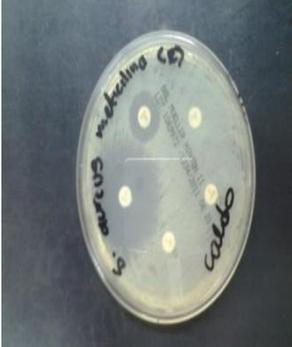
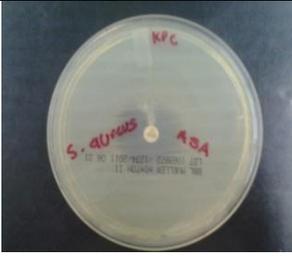
S. aureus, presento un comportamiento similar a lo reportado por *L.G. Harris, 2002* (16). Comportamiento que cumple con todas las fases de crecimiento esperado.

La resistencia antibiótica de las cepas, fue confirmada mediante el método de Difusión en Disco. No se presentaron halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* para los antibióticos Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriazona y Aztreonam, cuyos valores pueden observarse en la Tabla 1. Los valores de los halos de 0mm de diámetro, reflejan que *E. coli* es resistente a los antibióticos propuestos. (14)

Por otro lado *S. aureus* fue sensible frente a Clindamicina, Ciprofloxacina y resistente a Meticilina, Oxacilina y Cefoxitin. *Pseudomonas* presento resistencia frente a Cefoperaxona, Impenem y Ciprofloxacina.

El test de Hodge (14) fue el empleado para determinar la producción de Carbapenemasas por parte de *K.pneumoniae* que fue positiva frente a esta prueba. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Confirmación del perfil de resistencia de las cepas evaluadas.

<i>E. coli</i>	Antibiograma	<i>S. aureus</i>	Antibiograma
Ceftazidima(R)*: 0mm Cefotaxima(R)*:0 mm Ceftriazona(R)*: 0mm Aztreonam(R)*: 0mm		Clindamicina((R) *:0mm Ciprofloxacina(S) **30mm Meticilina:(R)*0m m Oxacilina(R)*:0m m Cefoxitin:11mm (R)*	
<i>P. aeruginosa</i>	Antibiograma	<i>K. pneumoniae</i>	Antibiograma
Cefoperaxona(R) *9mm Imipenem:(R)*11 mm Ciprofloxacina(S) **19mm		Test de Hodge: Meropenem (R)*	

*(R)=Resistente

** (S)=Sensible

El único criterio válido de muerte bacteriana es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción. Cuando una población bacteriana se expone a un agente letal o se somete a un procedimiento físico de esterilización se produce, a medida que transcurre el tiempo, una progresiva reducción del número de bacterias sobrevivientes, es decir, el número de microorganismos viables disminuye en forma exponencial. (17)

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LAS CUATRO CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES CON LAS CUATRO SOLUCIONES

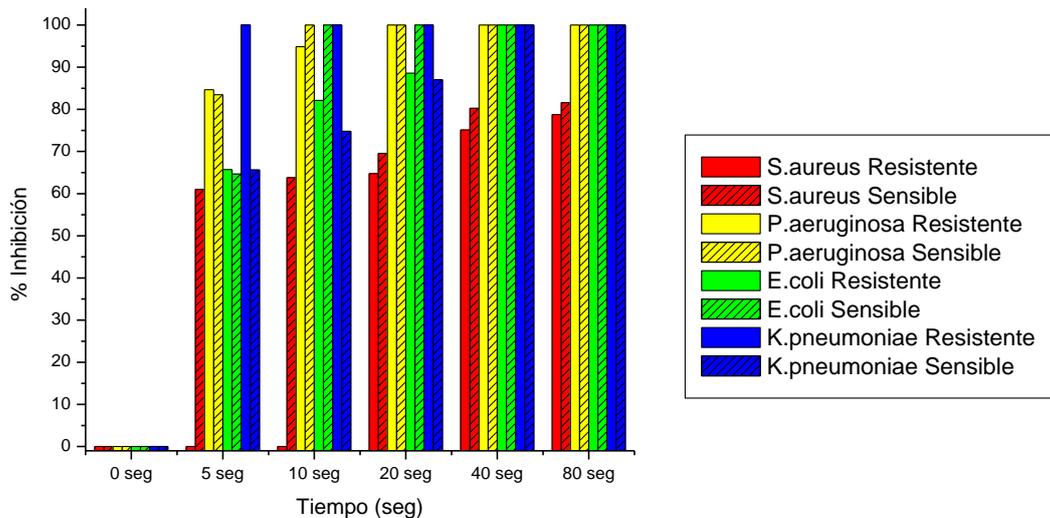


Figura 8. Porcentaje de inhibición de cepas sensibles y resistentes contra solución E a través del tiempo

La solución E, tardo en eliminar el 100% de la cepa *K.pneumoniae* resistente a los 5 segundos y *P.aeruginosa* y *E.coli* sensible a los 10 segundos. A los 40 segundos todas las cepas se inhibieron a excepción de *S.aureus* sensible y resistente a los antibióticos, que requiere de un tiempo mayor a 80 segundos para inhibirse completamente. (Figura 8). Este aspecto es importante desde el punto de vista clínico, en las intervenciones mayores, donde se suele preparar el campo operatorio luego de aplicar el antiséptico. Mientras se prepara el campo transcurre tiempo suficiente como para que el antiséptico ejerza su acción.

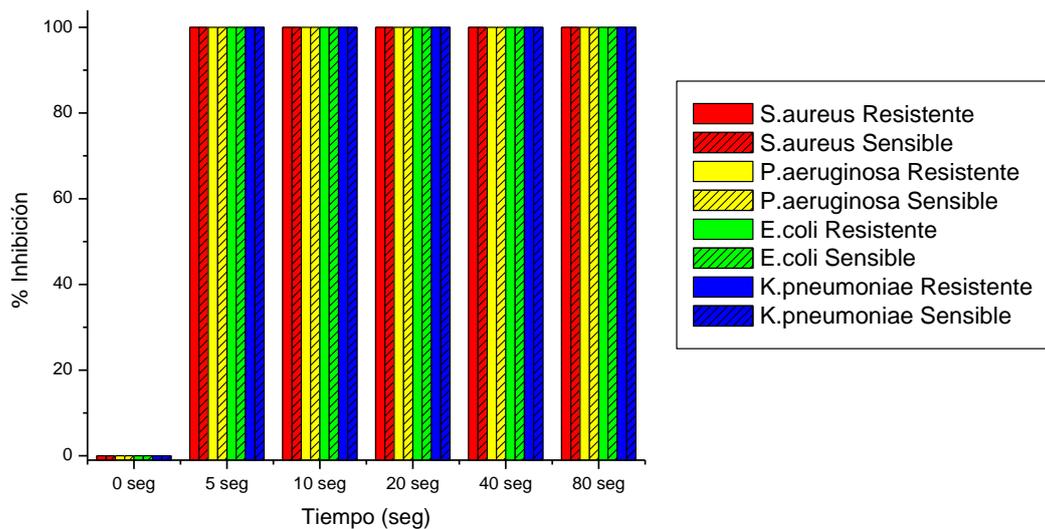


Figura 9. Porcentaje de inhibición de cepas sensibles y resistentes contra solución H a través del tiempo

El producto H, presento un porcentaje de inhibición de 100% a los 5 segundos, y ejerció su acción frente a cepas tanto sensibles como resistentes.

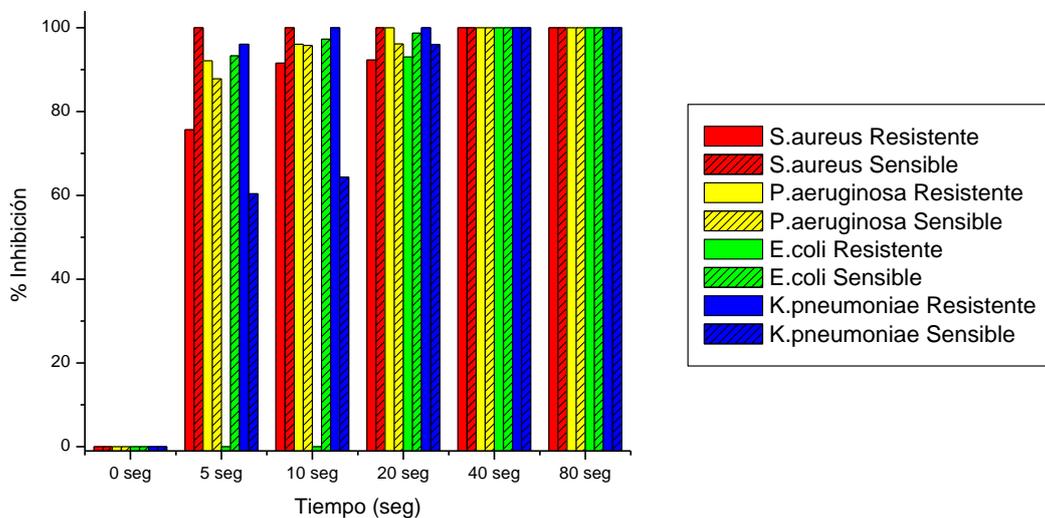


Figura 10. Porcentaje de inhibición de cepas sensibles y resistentes contra solución I a través del tiempo

La solución I, también fue eficaz, al ejercer su acción en un tiempo de 5 segundos para *S.aureus* sensible, 10 segundos para *K.pneumoniae* resistente, 20 segundos para *P.aeruginosa* resistente y 40 segundos para el resto de las cepas.

El tiempo de contacto es quizás uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, pues se espera que a mayor tiempo de exposición, mayor porcentaje de inhibición. Los protocolos establecidos para la desinfección y antisepsia con productos usados a nivel clínico, recomiendan un tiempo de contacto aproximado de 3 minutos con una acción bactericida desde los 15 segundos (7).

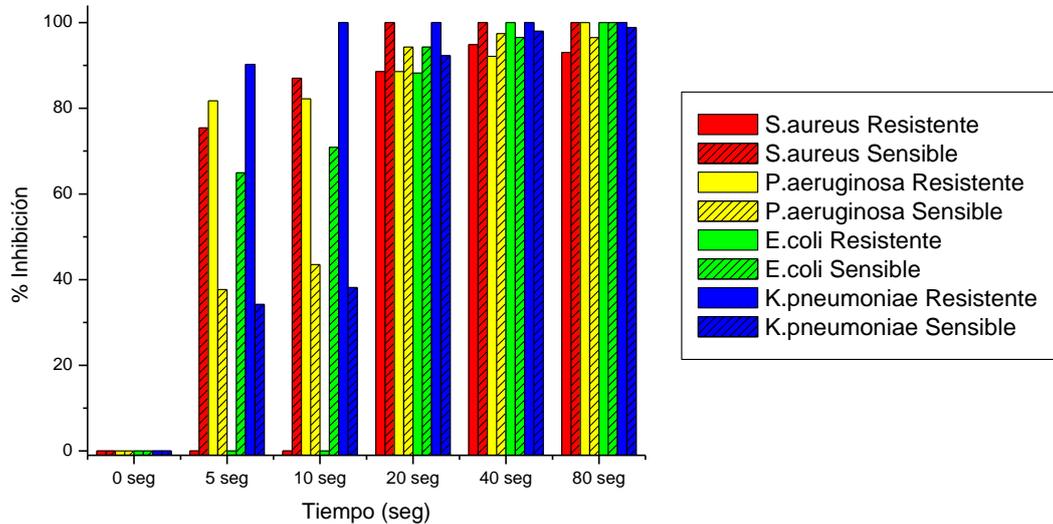


Figura 11. Porcentaje de inhibición de cepas sensibles y resistentes contra solución J a través del tiempo

La solución J, tuvo la menor actividad inhibitoria; la reducción exponencial de *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* sensibles y *S.aureus* resistente tardó un tiempo mayor a 80 segundos, siendo *Klebsiella pneumoniae* resistente la más sensible frente a este producto con un porcentaje del 100% a los 10 segundos, y *S.aureus* a los 20 segundos.

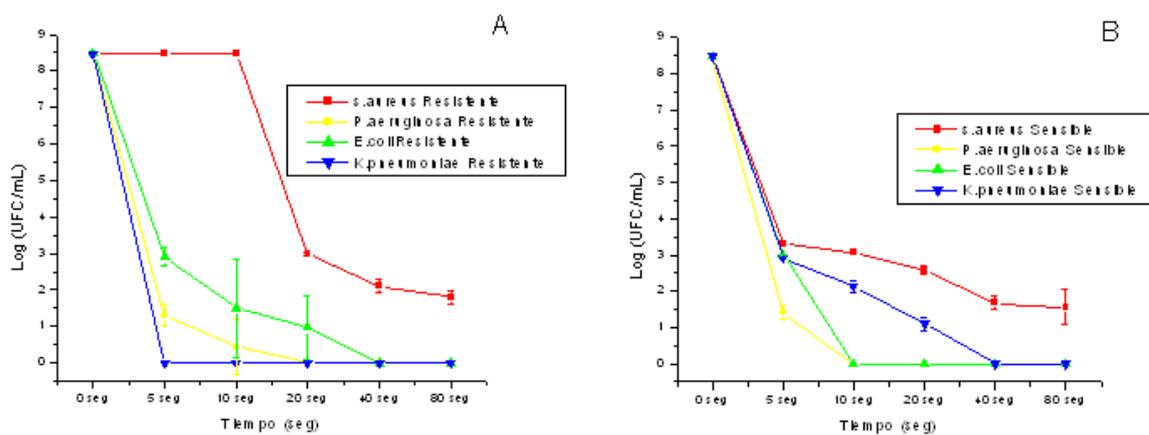


Figura 12. Log(UFC/mL) a través del tiempo de todas las cepas frente a la Solución E donde A. Cepas Multirresistentes B. Cepas Sensibles

Al observar la figura 12, se puede observar que *Pseudomonas aeruginosa* se inhibió rápidamente, tanto para cepas sensibles como resistentes respecto a las otras bacterias. La membrana externa de *P. aeruginosa* es responsable de su alta resistencia, en comparación con otros microorganismos, posiblemente debido a las diferencias en la composición de Lipopolisacárido y en el contenido de cationes de la membrana externa (23). Los altos contenidos de Mg forman fuertes vínculos con el lipopolisacárido y, además, debido a su pequeño tamaño, las porinas pueden no permitir la difusión general a través de ellos. A pesar de ser reportada como una bacteria resistente, en este trabajo presento alta sensibilidad frente a todos los productos.

Por el contrario *S. aureus* resistente a los antibióticos fue la cepa que más se demoró para inhibirse completamente, incluso más de 80 segundos de prueba. Las bacterias Gram positivas tienden a ser más sensibles que las Gram negativas

La pared celular de los estafilococos se compone esencialmente de peptidoglicano y ácido teicoico. Ninguno de estos parece actuar como una eficaz barrera a la entrada de los antisépticos y desinfectantes. Sustancias de alto peso Molecular pueden atravesar fácilmente la pared celular de estafilococo lo que podría explicar posiblemente la sensibilidad de estos microorganismos a muchos agentes antibacterianos incluyendo QAC y de Clorhexidina. (13)

Sin embargo, en la naturaleza, *S. aureus* puede existir como una cepa rodeada por una capa mucóide. Aquellas cepas no mucóides son eliminadas más rápidamente que las cepas mucóides por ciertos antisépticos; Por lo tanto, este exopolisacárido juega un papel protector, ya sea como una barrera física a la penetración desinfectante o como una capa suelta para interactuar o absorber las moléculas biocidas, lo que podría explicar el carácter resistente de esta cepa.(24)

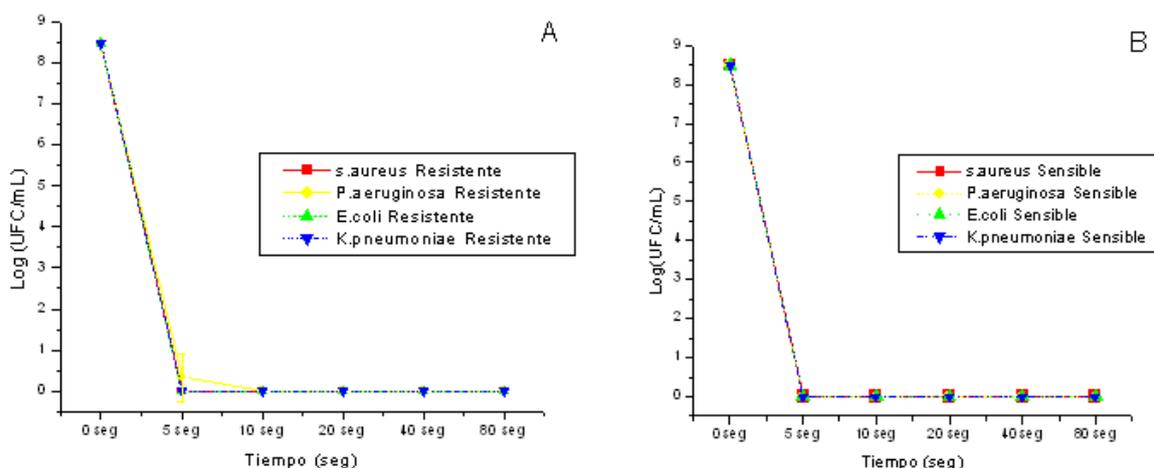


Figura 13. Log (UFC/mL) a través del tiempo de todas las cepas frente a la Solución H en donde A. Cepas Multirresistentes B. Cepas Sensibles

El producto H fue capaz de inhibir tanto cepas sensibles como resistentes.

Existen varios factores que pueden intervenir en la acción de los antisépticos. La elección de un antiséptico debe cumplir con ciertas características que lo hacen ideal para su empleo. La concentración de estos es determinante a la hora de su uso contra agentes microbianos. Siguiendo esta premisa, es posible que la solución H tenga una elevada concentración del producto, de tal forma que sea tóxico para las bacterias, incluso para *P. aeruginosa* que se ha reportado resistente a la mayoría de los antisépticos y desinfectantes.

El tipo de célula es otro aspecto importante. La membrana externa de bacterias gram-negativas actúa como una barrera que limita la entrada de muchos tipos de agentes antimicrobianos.

Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. (13) Además de las vías antes descritas se ha propuesto una tercera vía para agentes catiónicos como los CAC, Biguanidas y Diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación.

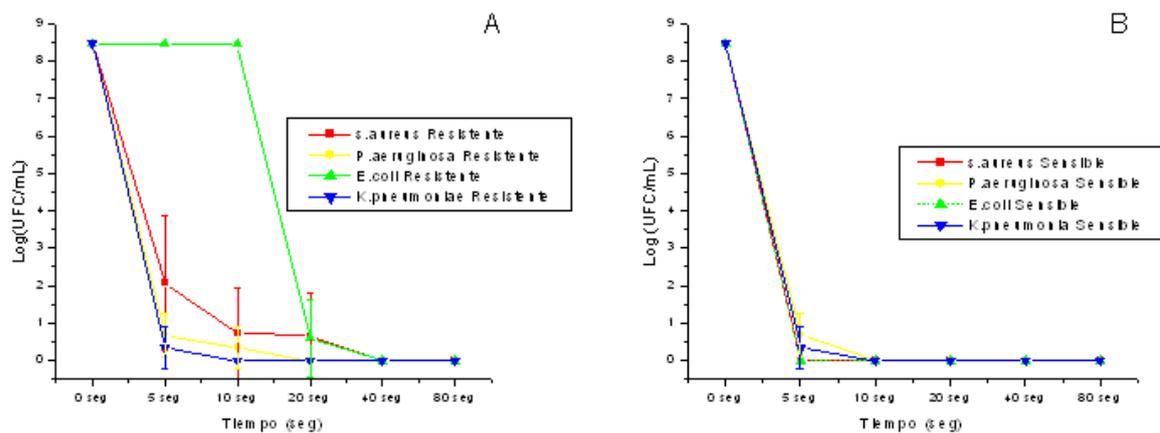


Figura 14. Log (UFC/mL) a través del tiempo de todas las cepas frente a la Solución I en donde A. Cepas Multirresistentes B. Cepas Sensibles

Para que un antiséptico o desinfectante pueda llegar a su sitio activo, las capas externas de una célula deben ser atravesadas. La naturaleza y la composición de estas membranas dependen del tipo de microorganismo y pueden actuar como una barrera de permeabilidad, en el que puede haber una captación reducida. Por otra parte, pero con menos frecuencia, existen enzimas constitutivamente sintetizados que pueden provocar la degradación de un compuesto (13)

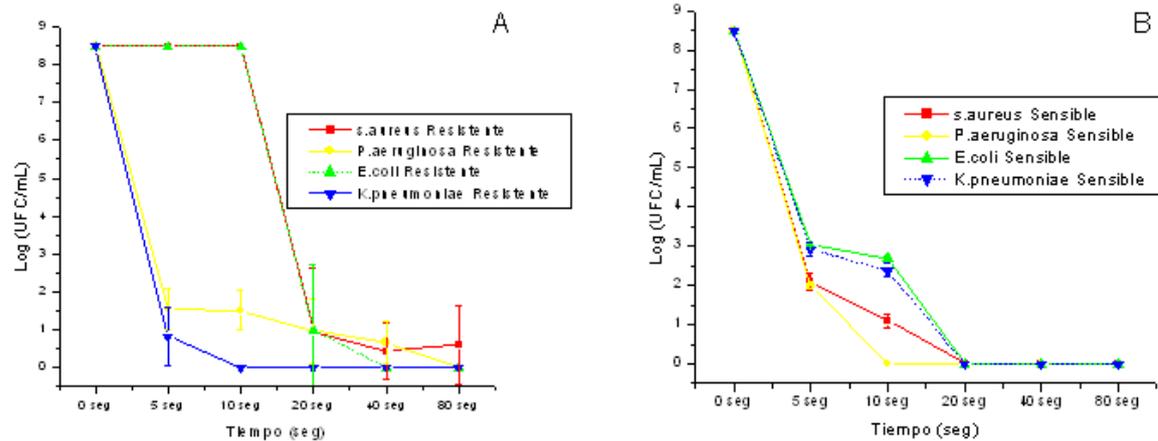


Figura 15. Log (UFC/mL) a través del tiempo de todas las cepas frente a la Solución J en donde A. Cepas Multirresistentes B. Cepas Sensibles

Pocos autores han considerado el peptidoglicano en bacterias gram-negativas como un posible obstáculo a la entrada de sustancias inhibidoras. El contenido de peptidoglicano de estos microorganismos es mucho menor que en los estafilococos, que son inherentemente más sensible a muchos antisépticos y desinfectantes. (13)

La asociación de microorganismos con superficies sólidas conduce a la generación de una biopelícula, que se define como un consorcio de organismos organizados dentro de un exopolisacárido o exopolímero. Las biopelículas son importantes por varias razones, desempeñan un papel en la protección contra la deshidratación de la célula microbiana, la fagocitosis, el ataque de bacteriófagos, antibióticos. (24)

La colonización se produce en biomateriales implantados y dispositivos médicos, resultando en el aumento de las tasas de infección y la recurrencia de infecciones. Dentro de las profundidades de un biofilm, por ejemplo, las limitaciones de nutrientes es probable que reduzcan las tasas de crecimiento, lo que puede afectar a la susceptibilidad a los antibióticos. Bacterias de lento crecimiento son particularmente insensibles. (24)

Patógenos Gram negativos puede crecer como biopelículas catéter en la vejiga. Las biopelículas son el ejemplo más importante de la forma fisiológica (fenotípica) la adaptación puede desempeñar un papel en el otorgamiento resistencia intrínseca. (13)

Además, muchos de los microorganismos anaerobios facultativos han desarrollado sistemas de defensa intrínsecas que le confieren tolerancia al estrés peróxido (H₂O₂ en particular In vivo. la respuesta de la llamada estrés oxidativo o SOS ha sido bien estudiado en *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, incluye la producción de enzimas para neutralizar y prevenir el daño celular (incluyendo peroxidasas, catalasas, glutatión reductasa) y reparación de Lesiones de ADN. (13)

CONCLUSIONES

El producto H fue el más eficiente. Mostró inhibición del 100% de las cepas evaluadas, independientemente de si eran cepas sensibles o resistentes.

En el caso de la cepa resistente de *E coli*, las soluciones E, I, J, muestran un 100% de inhibición luego de 40 segundos de contacto. Con la cepa sensible, los tiempos de inhibición varían desde 10, 40 y 80 segundos con las soluciones E, I, J respectivamente.

S. aureus, mostró una alta capacidad para contrarrestar la acción de los antisépticos. Para el producto I la actividad antiséptica del 100% frente a esta cepa resistente se evidenció después de los 40 segundos y luego de 5 segundos frente a la cepa sensible. En el caso del producto J, se logró el 100% de inhibición luego de 20 segundos con la cepa resistente y de 80 segundos con la cepa sensible. La solución E mostró acción inhibitoria del 100% luego de 80 segundos de contacto tanto con la cepa sensible como con la resistente.

La acción antiséptica e inhibitoria para la cepa sensible de *P. aeruginosa* se evidenció después de 5, 10, 40 y 80 segundos, para las soluciones H, E, I, J, respectivamente. Frente a la cepa resistente la acción inhibitoria del 100% de los productos H, E, I, J, se presentó luego de 5, 20, 20 y 80 segundos respectivamente.

La cepa más sensible a los antisépticos fue *K.pneumoniae* resistente respecto a *K.pneumoniae* sensible en las soluciones E, I y J. con tiempos entre 5 segundos, 10 y 10 segundos 40 ,40 segundos y >80 respectivamente.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar los ensayos con tiempos mayores de exposición, preferiblemente los estandarizados a nivel clínico, así como realizar el ensayo a diferentes concentraciones de los Antisépticos. También es importante realizar un Screening de las cepas sensibles y resistentes más comúnmente aisladas de pacientes cateterizados con estancia en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario San Ignacio para estandarizar tiempos y productos más adecuados para su eliminación.

El producto H, es recomendado para su uso en los procesos de limpieza y desinfección hospitalaria.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Centers for Disease Control and prevention. (CDC). Questions and Answers: Disease Infection-Control Practices 2010; **31**:257-260.
- (2) World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections A practical guide 2002; **12**.
- (3) Kramer A, Kellner B, Partecke L, Koburger T, Heidecke C, Kohlmann T. Determination of antiseptics efficacy of rubs on the forearm and consequences for surgical hand disinfection. *Journal of hospital infection* 2011. **78**: 11-15

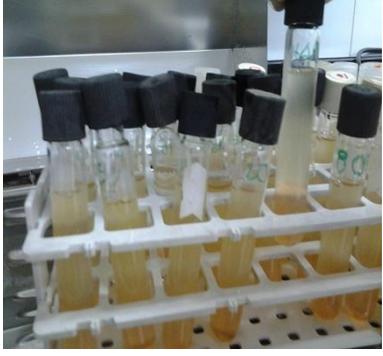
- (4) Lautenbach E, Patel J B, Bilker W B, Edelstein P H, Fishman N O Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes
- (5) Zhang M, O'Donoghue M M, Ito T, Hiramatsu K, M.V. Boost Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *Journal of hospital infection*. 2011. **78**: 113–117
- (6) Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, A. Mahamat J.P. Daure, Sotto A. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection* 2004. **57**:209–216
- (7) Hübner N, Günter K, Löffler H, Kramer A. Effect of a 1 min hand wash on the bactericidal efficacy of consecutive surgical hand disinfection with standard alcohols and on skin hydration. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2006. **209**: 28-291.
- (8) Pitten F A, Werner H P, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *Journal of Hospital Infection*.2003. **55**: 108–115.
- (9) Messenger S, Goddard P.A, Dettmar P W, Maillard J Y. Comparison of two in vivo and two ex vivo tests to assess the antibacterial activity of several antiseptics. *Journal of Hospital Infection* 2004. **58**: 115–121
- (10) Russel, A.D., Hugo, W.B. y Ayliffe, G.A.J. (1999). Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization 3ª ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- (11) Cutmed. Pancreat. Manual básico de Microbiología. http://www.Pancreat.es/pdf/manualcultimed_pdf consultado el 24 marzo de 2012
- (12) Jaime Rodríguez, Carolina. 2002. Validación de desinfectantes usados en las áreas de producción de una industria farmacéutica en Bogotá. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota D.C. 75 pp.
- (13) Mcdonnell G, Russell A D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance *Clinical Microbiology reviews*.1999. **12**: 147–179
- (14) CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standard Institute. USA. Wayne. 2012; **32**(3)1-188.
- (15) www.academia.cat/societats/farmcl/l libre/higiene/332.pdf consultado el 25 de mayo de 2012.
- (16) Evaluación del método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma NTC 5473 DE 2007
- (17) Ramírez SJ, Contreras GF, Gómez MC. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista latinoamericana de Microbiología*. 2005; **47**,3 – 101
- (18) Orsi C, Kawaguti Y, Sato H. Glucosyl Transferasa Production by *Klebsiella sp* K18 and Conversión of Sucrose to Palatinose using inmovilized cells. *Brazillian Journal of Microbiology* 2009; **40**:76-72
- (19) England L, Gorzelak M, Trevors J. Growth and membrane polarization in *Pseudomonas aureginosa* UG2 grown in randomized microgravity in a high aspect ratio vessel. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; **1624**:76-80
- (20) Cabrera C, Gómez R, Zúñiga A. La Resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 2007; **38**:149-158.
- (21) Russell A. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of applied Microbiology*. 1997; **82**:155-166.
- (22) Microbial Response to Disinfectants. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. <http://es.scribd.com/doc/29613892/Handbook-Water-Waste-Water-Microbiology>. consultado el 27 de mayo de 2012.

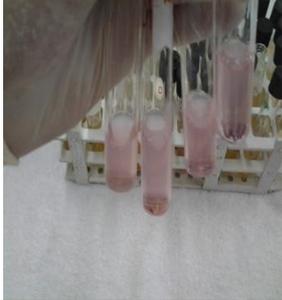
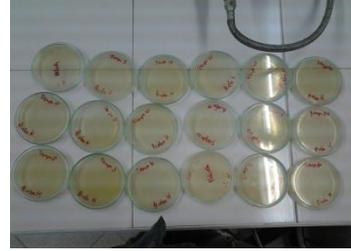
- (23) Tenover F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine* 2006.**28**:3-10.
- (24) Danese P N, Pratt L A, Kolter R. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of Escherichia coli K-12 Biofilm Architecture. *Journal of Bacteriology*. 2000. **182**:3593–3596

ANEXOS

Tabla 2: Fotografías de realización de tesis

Realización curva de crecimiento en shaker e incubadora	Ensayo de neutralización con solución H	Ensayo de neutralización por triplicado
		
Ensayo de neutralización	Cajas por triplicado para	Soluciones H, E, J y I

solución E triplicado	recuento	
		
Ensayo de neutralización en diferentes tiempos en baño termostático para controlar $T^{\circ}=20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	Ensayo de neutralización en diferentes tiempos en baño termostático para controlar $T^{\circ}=20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	Soluciones con microorganismos en diversos tiempos neutralizadas con Letheen
		

Solución H mas microorganismo	Solución E mas microorganismo	Recuento de siembra en superficie de ensayos
		
Recuentos de siembra en superficie	Soluciones brindadas por Laboratorios Vicar	Curva Diluciones <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

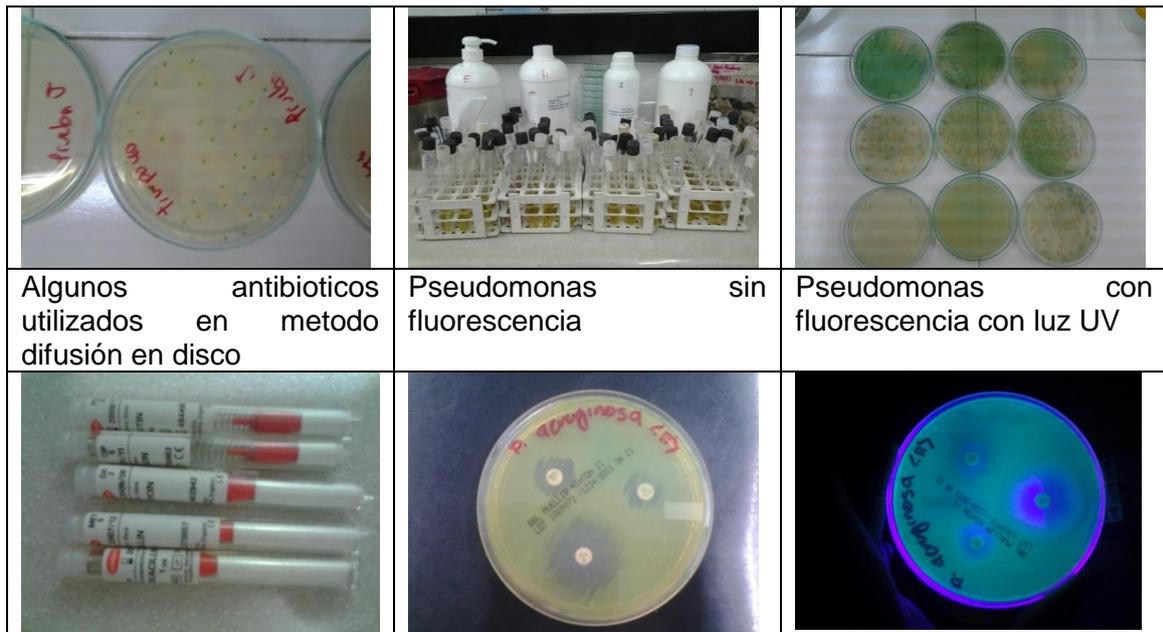


Tabla 3. Perfiles de resistencia

PERFILES DE RESISTENCIA

<p>Ceftazidima R <17</p>	<p>E.coli</p>
<p>CEFOPERAZONA R <15</p>	<p>Pseudomonas</p>
<p>AZTREONAM <27</p>	<p>E.coli</p>
<p>IMIPENEM <19</p>	<p>Pseudomonas</p>
<p>MEROPENEM <19</p>	<p>Klebsiella pneumoniae</p>
<p>CIPROFLOXACINA <15</p>	<p>Pseudomonas, SARM</p>
<p>CEFOTAXIMA <27</p>	<p>E. coli</p>

Tabla 4: Curva de crecimiento *E.coli* BLEES

tiempo	Promedio	log(UFC/mL)
0	1,10E+05	5,04139269
1	1,85E+06	6,26717173
2	2,10E+07	7,32221929
4	3,40E+07	7,53147892
6	2,30E+08	8,36172784
8	2,20E+11	11,3424227
12	1,83E+11	11,2624511
18	3,08E+11	11,4885507

Tabla 5: Curva de crecimiento *S.aureus* SARM

tiempo	Promedio	log(UFC/mL)
0	2,20E+05	5,34242268
1	5,10E+06	6,70757018
2	9,60E+06	6,98227123
4	1,01E+08	8,00432137
6	7,70E+08	8,88649073
8	2,30E+10	10,3617278
12	2,10E+10	10,3222193
18	3,09E+10	10,4899585

Tabla 6: Curva de crecimiento *Klebsiella pneumoniae*

tiempo	Promedio	log(UFC/mL)
0	1,00E+06	6
1	1,50E+07	7,17609126
2	5,00E+07	7,69897
4	3,10E+08	8,49136169
6	4,20E+09	9,62324929
8	3,10E+08	8,49136169
12	5,00E+09	9,69897
18	1,50E+09	9,17609126

Tabla 7: Curva de crecimiento *Pseudomonas aeruginosa*

tiempo	Promedio	log(UFC/mL)
0	1,50E+05	5,17609126
1	2,50E+06	6,39794001
2	3,10E+06	6,49136169
4	9,50E+06	6,97772361
6	5,00E+07	7,69897
8	7,30E+08	8,86332286
12	2,80E+09	9,44715803
18	2,40E+10	10,3802112

Tabla 8: Ensayo de neutralización *S.aureus* SARM con solución E, H,I y J.

solución E					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
10	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
20	2,95424251	2,99122608	3,01703334	2,98750064	0,03156075
40	1,90308999	2,2787536	2,14612804	2,10932387	0,19051692
80	1,84509804	1,60205999	1,95424251	1,80046685	0,18028336

Solución H					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0

solución I					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	0	3,11394335	3,07918125	2,06437487	1,78788556
10	0	0	2,14612804	0,71537601	1,2390676
20	0	1,95424251	0	0,65141417	1,12828244
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0

Solución J					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
10	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
20	2,90308999	0	0	0,96769666	1,67609979
40	0	1,30103	0	0,43367667	0,75115002
80	0	1,77815125	0	0,59271708	1,0266161

Tabla 9: Ensayo de neutralización *Pseudomonas aeruginosa* con solución E, H, I y J.

solución E						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	1	1,60205999	1,30103	1,30103	0,30103	
10	1,30103	0	0	0,43367667	0,75115002	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
Solución H						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	1	0	0	0,33333333	0,57735027	
10	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
solución I						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	1	0	1	0,66666667	0,57735027	
10	1	0	0	0,33333333	0,57735027	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
solución J						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	2,04139269	1,60205999	1	1,54781756	0,52281102	
10	2,04139269	1	1,47712125	1,50617131	0,52130376	
20	1,60205999	1,30103	0	0,96769666	0,85145898	
40	1	1	0	0,66666667	0,57735027	
80	0	0	0	0	0	

Tabla 10: Ensayo de neutralización *E.coli* BLEES con solución E, H,I y J.

solución E					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	3,14921911	2,90308999	2,66275783	2,90502231	0,2432364
10	2,59106461	0	1,95424251	1,51510237	1,35019887
20	0	1,30103	1,60205999	0,96769666	0,85145898
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
solución H					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
solución I					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
10	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
20	1,77815125	0	0	0,59271708	1,0266161
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
solución J					
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
5	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
10	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0
20	3	0	0	1	1,73205081
40	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0

Tabla 11: Ensayo de neutralización con *Klebsiella pneumoniae* solución E, H,I y J.

solución E						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
solución H						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
solución I						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	1	0	0	0,33333333	0,57735027	
10	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	
solución J						
tiempo	r1 log10	r2 log10	r3 log10	promedio	D.S	
0	8,47712125	8,47712125	8,47712125	8,47712125	0	
5	1,47712125	0	1	0,82570708	0,75382711	
10	0	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	0	
40	0	0	0	0	0	
80	0	0	0	0	0	

Tabla 12: Porcentajes de Inhibición de *S.aureus* SARM frente a las soluciones E,H,I y J.

Solución E				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0	0	0	0	0
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	65,150404	64,7141289	64,4096947	64,7580759
40	77,55028	73,1187802	74,683292	75,1174507
80	78,2343795	81,1013675	76,9468614	78,7608695

Solución H				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0	0	0	0	0
5	100	100	100	100
10	100	100	100	100
20	100	100	100	100
40	100	100	100	100
80	100	100	100	100

Solución I				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0	0	0	0	0
5	100	63,2664998	63,6765695	75,6476898
10	100	100	74,683292	91,5610973
20	100	76,9468614	100	92,3156205
40	100	100	100	100
80	100	100	100	100

solución J				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0	0	0	0	0
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
20	65,7538226	100	100	88,5846075
40	100	84,652455	100	94,8841517
80	100	79,0241145	100	93,0080382

Tabla 13: Porcentajes de Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente a las soluciones E,H,I y J.

Solución E					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	88,2035426	81,1013675	84,652455	84,652455	
10	84,652455		100	100	94,8841517
20		100	100	100	
40		100	100	100	
80		100	100	100	

solución H					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	88,2035426		100	100	96,0678475
10		100	100	100	
20		100	100	100	
40		100	100	100	
80		100	100	100	

solución I					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	88,2035426		100	88,2035426	92,135695
10	88,2035426		100	100	96,0678475
20		100	100	100	
40		100	100	100	
80		100	100	100	

solución J					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	75,9187981	81,1013675	88,2035426	81,7412361	
10	75,9187981	88,2035426	82,575202	82,2325142	
20	81,1013675	84,652455		100	88,5846075
40	88,2035426	88,2035426		100	92,135695
80		100	100	100	

Tabla 14: Porcentajes de Inhibición de *E.coli* BLEES frente a las soluciones E,H,I y J.

Solución E				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0		0	0	0
5	62,8503708	65,7538226	68,5888906	65,731028
10	69,4346167		100	76,9468614
20		100	84,652455	81,1013675
40		100	100	100
80		100	100	100

Solución H				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0		0	0	0
5		100	100	100
10		100	100	100
20		100	100	100
40		100	100	100
80		100	100	100

solución I				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0		0	0	0
5		0	0	0
10		0	0	0
20	79,0241145		100	100
40		100	100	100
80		100	100	100

solución J				
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio
0		0	0	0
5		0	0	0
10		0	0	0
20	64,6106277		100	100
40		100	100	100
80		100	100	100

Tabla 15: Porcentajes de Inhibición de *Klebsiella pneumoniae* frente a las soluciones E,H,I y J.

Solución E					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5		100	100	100	100
10		100	100	100	100
20		100	100	100	100
40		100	100	100	100
80		100	100	100	100

solución H					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5		100	100	100	100
10		100	100	100	100
20		100	100	100	100
40		100	100	100	100
80		100	100	100	100

Solución I					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	88,2035426		100	100	96,0678475
10		100	100	100	100
20		100	100	100	100
40		100	100	100	100
80		100	100	100	100

Solución J					
tiempo	r1 %	r2 %	r3%	Promedio	
0		0	0	0	0
5	82,575202	88,2035426	100	100	90,2595815
10		100	100	100	100
20		100	100	100	100
40		100	100	100	100
80		100	100	100	100

Tabla 19. Porcentaje de inhibición tanto de cepas resistentes como de cepas sensibles a través del tiempo con la solución J.

Solución J	% de Inhibición							
	S.aureus R	S.aureus S	P.aeruginosa R	P.aeruginosa S	E.coli R	E.coli S	K.pneumoniae R	K.pneumonia S
0 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
5 seg	0	75,41761	81,74123606	37,70880265	0	64,956	90,25958152	34,22156133
10 seg	0	87,01985	82,23251422	43,50992336	0	70,921	100	38,1435616
20 seg	88,58461	100	88,58460752	94,29230376	88,204	94,292	100	92,2627167
40 seg	94,88415	100	92,13569505	97,44207584	100	96,526	100	97,98933316
80 seg	93,00804	100	100	96,50401908	100	100	100	98,83467303

Tabla 20 cepas resistentes Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución E.

Solución E	Resistentes Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0
5 seg	8,47712125	0	1,301029996	0,301	2,90502231	0,2432	0	0
10 seg	8,47712125	0	0,433676665	0,7512	1,515102372	1,3502	0	0
20 seg	2,98750064	0,032	0	0	0,967696662	0,8515	0	0
40 seg	2,10932387	0,191	0	0	0	0	0	0
80 seg	1,80046685	0,18	0	0	0	0	0	0

Tabla 21 . cepas sensibles Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución E.

Solución E	Sensibles Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0
5 seg	3,30532664	0,006	1,401373328	0,1738	2,995620423	0,0044	2,913619956	0,016
10 seg	3,0680494	0,013	0	0	0	0	2,137878332	0,161
20 seg	2,57938203	0,102	0	0	0	0	1,100343332	0,174
40 seg	1,67372977	0,185	0	0	0	0	0	0
80 seg	1,56041375	0,489	0	0	0	0	0	0

Tabla 22. cepas resistentes Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución H.

Solución H	Resistentes Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0
5 seg	0	0	0,333333333	0,5774	0	0	0	0
10 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
20 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
40 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
80 seg	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 23. cepas sensibles Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución H.

Solución H	Sensibles Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E

0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0
5 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
10 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
20 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
40 seg	0	0	0	0	0	0	0	0
80 seg	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 24. cepas resistentes Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución I.

Solución I		Resistentes Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E	
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0	
5 seg	2,06437487	1,788	0,666666667	0,5774	8,477121255	0	0,333333333	0,577	
10 seg	0,71537601	1,239	0,333333333	0,5774	8,477121255	0	0	0	
20 seg	0,65141417	1,128	0	0	0,592717083	1,0266	0	0	
40 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	
80 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 25. cepas sensibles Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución I.

Solución I		Sensibles Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E	
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0	
5 seg	0	0	0,666666667	0,5774	0	0	0,333333333	0,577	
10 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	
20 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	
40 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	
80 seg	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabla 26. cepas resistentes Log(UFC/mL) a través del tiempo con la solución J.

Solución J		Resistentes Log(UFC/mL)							
Tiempo (seg)	S.aureus	D.E	P.aeruginosa	D.E	E.coli	D.E	K.pneumoniae	D.E	
0 seg	8,47712125	0	8,477121255	0	8,477121255	0	8,477121255	0	
5 seg	8,47712125	0	1,547817559	0,5228	8,477121255	0	0,825707085	0,754	
10 seg	8,47712125	0	1,506171313	0,5213	8,477121255	0	0	0	
20 seg	0,96769666	1,676	0,967696662	0,8515	1	1,7321	0	0	
40 seg	0,43367667	0,751	0,666666667	0,5774	0	0	0	0	

