

**RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS Y
ANTISÉPTICOS MAS USADOS A NIVEL HOSPITALARIO**

Presentado por

BRIGITTE MARLADY HUERFANO ROMERO



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTA D.C.

2011

**RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS Y
ANTISÉPTICOS MAS USADOS A NIVEL HOSPITALARIO**

BRIGITTE MARLADY HUERFANO ROMERO

APROBADO

Ingrid Schuler. Ph.D

Decana Académica

Facultad de Ciencias

Diana Patiño Cuervo. MSc

Directora carrera de Bacteriología

Facultad de Ciencias

**RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS Y
ANTISÉPTICOS MAS USADOS A NIVEL HOSPITALARIO**

BRIGITTE MARLADY HUERFANO ROMERO

TUTOR

LIBARDO HERNANDEZ

CODIRECTORA

JANETH ARIAS PALACIOS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTA D.C.

2011

**RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS Y
ANTISÉPTICOS MAS USADOS A NIVEL HOSPITALARIO**

BRIGITTE MARLADY HUERFANO ROMERO

APROBADO

LIBARDO HERNANDEZ

TUTOR

JANETH ARIAS PALACIOS

CODIRECTORA

DIANA PATRICIA ALDANA

JURADO

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. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MARCO TEORICO	11
4.1. Resistencia a antimicrobianos.....	11
4.2. Resistencia a desinfectantes	14
4.3. Mecanismo de acción de los desinfectantes.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. MATERIALES.....	17
5.2. Antibiogramas	18
5.3. Valoración de desinfectantes.....	18
5.3.1. Establecimiento de las condiciones experimentales:.....	18
5.4. Análisis de los resultados	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1 Curvas de crecimiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
6.2 Valoración de resistencia al alcohol glicerinado.....	24
6.3 Valoración de la resistencia frente a las dos concentraciones de clorhexidina.....	28
7. CONCLUSIONES.....	34
8. RECOMENDACIONES.....	35
9. BIBLIOGRAFÍA:.....	36
10. ANEXO 1.....	39

1. RESUMEN

Las infecciones intrahospitalarias son cada vez más frecuentes gracias a la tolerancia o resistencia adquirida de las cepas frente a los agentes desinfectantes usados en el proceso de esterilización en las instalaciones médicas. Éstas infecciones causan la complicación del cuadro clínico de pacientes hospitalizados que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos, cateterizados, con lesiones abiertas o post operatorios. **Objetivo:** El objetivo de éste trabajo es determinar la resistencia o tolerancia de cepas multirresistentes a antibióticos, (*Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) frente a un antiséptico (alcohol glicerinado) y un desinfectante (clorhexidina) para establecer una relación entre las resistencia frente a antibióticos y la posiblemente presentada frente a los agentes desinfectantes. **Materiales y métodos:** Con el fin de conocer la tendencia de crecimiento de cada cepa se realizó una curva de crecimiento. Para esto se realizó un crecimiento en caldo tripticosa soya en un erlenmeyer de 100mL a una relación de 1/2. El proceso se llevó a cabo por un tiempo de 10 horas incubado a 37 °C con una agitación de 150rpm. Éste procedimiento para cada cepa. Por otro lado se evaluó la resistencia frente al antiséptico “clean hands”, a base de alcohol glicerinado a una concentración del 68%, un desinfectante con alcohol al 61% y clorhexidina al 1% y otro con alcohol al 61% y clorhexidina al 2%. Para esto se pusieron en contacto 8mL del desinfectante con 2mL de suspensión celular estandarizada al tubo 2 de Mac Farland durante el tiempo de estudio: (0, 1, 2, 4, 8, 16 minutos). Al terminar el tiempo de exposición se tomaron 2mL de ésta solución y se mezclaron con 8mL del neutralizante, (caldo Lethen) durante 5 minutos. Finalmente se sembró 0,1mL masivamente, por triplicado en agar TSA incubando a 37°C. Por último se realizó el recuento teniendo en cuenta la dilución realizada. **Resultados:** Como resultado se observó una resistencia frente al agente antiséptico clean hands por parte de *Klebsiella pneumoniae* presentando crecimiento hasta 16 minutos. Para el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se evidencia un crecimiento hasta los 4 minutos lo que indica una tolerancia frente a

al antiséptico evaluado. Por otro lado, frente a la evaluación de la clorhexidina al 1%, se evidencia una inhibición de crecimiento en 4 minutos para la *Pseudomonas aeruginosa* y en 2 minutos para la *Klebsiella pneumoniae*. Por otro lado en la evaluación de clorhexidina al 2% se observa la inhibición total de la cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* y una tolerancia para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* presentando crecimiento en el tiempo de 2 minutos.

Conclusiones: De acuerdo a los resultados observados se puede concluir que las dos cepas evaluadas presentan resistencia frente al alcohol glicerinado lo que obliga a, si no a una mejora en la fórmula del antiséptico, sí a un aumento en el tiempo de contacto para asegurar la inhibición bacteriana. Adicionalmente se concluye que para *Klebsiella pneumoniae* el desinfectante de clorhexidina al 2% inhibe por completo el crecimiento bacteriano. Por el contrario, aún con la concentración de clorhexidina al 2% se presenta crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con un recuento menor en comparación con la concentración de clorhexidina al 1%.

2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana es un mecanismo por el cual las diferentes bacterias sobreviven al efecto de los antimicrobianos desarrollándose de tal manera que se convierten en cepas multiresistentes capaces de generar infecciones severas en los humanos. Evolutivamente, éste tipo de microorganismos ha generado diferentes procesos por los cuales logran inhibir la acción del antibiótico, gracias a las malas prácticas en el uso por parte de la sociedad. Además de éste existen otros factores como el deficiente control de infecciones intrahospitalarias, la falta de campañas para la sociedad en cuanto a la importancia del adecuado manejo de antibióticos, los procedimientos quirúrgicos invasivos etc (1).

Este fenómeno de la resistencia a los antibióticos se ha documentado desde el momento en que aparecen los antibióticos del orden de la penicilina, donde al poco tiempo se documentó la resistencia de algunas cepas bacterianas frente a éste grupo y a la meticilina como es el caso de *Staphylococcus aureus*, causando una mayor morbilidad, mortalidad y ocasionando efectos sociales y económicos (2). De aquí surge la necesidad de desarrollar otras sustancias con efecto bactericida, sin causar daño en el cuerpo humano, surgiendo grupos como los aminoglucosidos, betalactámicos etc.

A nivel hospitalario, la gran mayoría de agentes antimicrobianos empleados para el tratamiento de infecciones por bacterias, son aquellos considerados de primera línea. Por tal motivo, surge un problema social que abarca desde el uso limitado de éstos antibióticos frente a una cepa bacteriana multiresistente, disminución de la calidad de vida del paciente y elevación en el costo para las entidades de salud por el alargamiento de estancias hospitalarias.

En este mismo escenario, se han empleado sustancias químicas para la inactivación y esterilización de zonas contaminadas. Este proceso de desinfección constituye un filtro indispensable para la no aparición de cepas multiresistentes que puedan causar infecciones intrahospitalarias complicando el estado de los

pacientes. Por tanto, la concentración de éstos desinfectantes debe ser aquella que pueda erradicar las bacterias y aquella que no sea suficientemente alta que pueda causar un efecto contradictorio en las aguas residuales de los hospitales convirtiéndose éstos efluentes en reservorios para la aparición de bacterias que adquieran resistencia a este tipo de sustancias.

Por tal motivo, el objetivo del éste trabajo es buscar la relación que existe entre la resistencia bacteriana a antimicrobianos y desinfectantes más usados a nivel hospitalario, usando como referencia cepas multirresistentes de muestras intrahospitalarias.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las bacterias multiresistentes a antibióticos presentan alguna resistencia a los antisépticos más usados a nivel hospitalario.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar 2 especies bacterianas multirresistentes a antibióticos provenientes del hospital San Ignacio a partir de muestras de pacientes que presentan infección.

- Establecer la tendencia de crecimiento de cada microorganismo a evaluar, por medio de la realización de curvas de crecimiento.
- Determinar la resistencia bacteriana frente a la clorhexidina al 1% y 2%, y el antiséptico alcohol glicerinado en 6 tiempos de exposición para determinar la inhibición de crecimiento.
- Interpretar los resultados obtenidos en la determinación de la resistencia, estableciendo la relación entre concentración y respuesta vs tiempo

4. MARCO TEORICO

Diferentes sustancias son usadas en el área de la salud como agentes desinfectantes. Diferentes factores afectan la acción biocida como la concentración celular, el tiempo de contacto, pH y temperatura entre otros. Los mecanismos de acción entre los antibióticos y agentes desinfectantes son muy similares, una de ellas es la penetración de agentes cationicos los cuales entran por difusión pasiva. Tal es el caso de la clorhexidina o desinfectantes de amonio cuaternario, en comparación con polimixinas y aminoglucósidos. El daño en la membrana ocasionada por la clorhexidina o antibióticos como la estreptomina, efectos en la síntesis de ADN donde interviene el mismo desinfectante anteriormente mencionado así como el caso de las fluoroquinolonas actinomicina (3).

4.1. Resistencia a antimicrobianos

La resistencia bacteriana a diferentes sustancias como antibióticos y desinfectantes es uno de los principales problemas en cuestión de salud, ya que

las infecciones por cepas multirresistentes han venido en aumento y en contraposición el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos en el tiempo es lenta. Dentro de los principales factores que llevan a ésta situación, se encuentra la descontrolada automedicación por parte de la sociedad, combinado con la mala dosificación y el tiempo de suministro del medicamento. Adicionalmente, los tratamientos sin resultado positivo a nivel intrahospitalario proporcionan resistencia a las cepas especialmente *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* entre otros (4).

Frente a los agentes antimicrobianos se encuentran cuatro principales puntos de acción que son la interferencia en la síntesis de pared celular dentro de los cuales se encuentran los beta-lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e incluso la vancomicina; inhibición en la síntesis de proteínas como los antibióticos pertenecientes a macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol entre otros; las fluoroquinolonas intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos incluyendo sulfonamidas y trimetropim y por último la intervención en las rutas metabólicas dado en el uso del trimetropim y sulfametoxazol (5)(6).

La resistencia bacteriana está clasificada en dos grupos: los que tienen una resistencia natural como es el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* frente a las benzilpenicilinas y trimetropim sulfa, característica dada por la alta impermeabilidad de su membrana celular convirtiéndola en un patógeno peligroso a nivel intrahospitalario (7). Por otro lado se encuentra el grupo de resistencia adquirida, que se caracteriza por un cambio o mutación puntual en la ADN dada por la presencia de plásmidos; secuencias de ADN que transportan los genes de resistencia, con capacidad de replicarse de manera independiente a la batería genética de la célula (8).

La conservación y adquisición de estos genes de resistencia se da gracias a la integración de plásmidos los cuales son fragmentos de ADN bacteriano que en su estructura guardan estos genes de resistencia. Por otro lado se encuentran los

trasposones que incluyen ADN de doble cadena que se puede traslocar entre los cromosomas o plásmidos mediante mecanismos de recombinación. Estos mecanismos involucran la presencia de integrones que permite capturar diferentes genes externos que pueden generar resistencia a diferentes agentes antibióticos.

Existen tres categorías básicas de resistencia a antibióticos, el primero es la inactivación del antibiótico donde éste es hidrolizado por enzimas secretas por la bacteria como es el caso de la producción de B-lactamasas la cual hidroliza el anillo betalactámico reduciendo su actividad antibacteriana y por tanto induce la resistencia a los B-lactámicos. Existen además otras enzimas como metilasas y transferasas que afectan principalmente a los antibióticos del grupo de los aminoglucósidos como la gentamicina y estreptomcina; oxacilinasas sintetizadas por un *Staphylococcus aureus* que degradan la oxacilina y derivados (9)(10).

El segundo mecanismo es la alteración del punto diana modificando pared celular, unidades ribosomales etc. Por ejemplo, en el caso de la resistencia frente a las quinolonas por parte de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* está dada por la mutación cromosómica de genes que codifican para las topoisomerasas I y II. Adicionalmente se presenta unas modificaciones estructurales en la enzima dihidrofolato reductasa generando menor afinidad por el antibiótico. Estas modificaciones se presentan también en un aminoácido de la subunidad ribosomal impidiendo la unión de los antibióticos como el caso de la resistencia a la rifampicina aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas (11).

La disminución de la permeabilidad celular se reconoce como otro mecanismo de resistencia. Esta permeabilidad está dada por la diferencia en la composición de la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde éstas últimas ponen más resistencia en la penetración de los fármacos debido a sus gruesas capas de lipopolisacáridos. Adicionalmente se habla de permeabilidad de membrana interna

donde se modifican las cargas eléctricas alterando el transporte aniónico el cual se encarga de internalizar el antibiótico (8)(12).

Es importante resaltar la resistencia que ha adquirido *Staphylococcus aureus* frente a antibióticos betalactámicos como la meticilina, debido a una mutación cromosómica que produce una proteína defectuosa ya que éste es uno de los microorganismos más frecuentes aislados de enfermedades infecciosas (11). Aunque éste antibiótico no es muy usado a nivel hospitalario, se ha usado como representante para evaluar la resistencia de *S. aureus* frente a las penicilinas.

4.2. Resistencia a desinfectantes

Los sistemas de desinfección realizados en un centro hospitalario se llevan a cabo con el fin de minimizar el riesgo de infección por material hospitalario, maximizando el control de bioseguridad para los pacientes y trabajadores del sector salud. Los desinfectantes de uso hospitalario deben tener una serie de características para que puedan ser usados en el proceso de desinfección de un laboratorio y del ambiente médico (ver tabla 1) (13).

Tabla 1: características de un desinfectante ideal

	CARACTERÍSTICAS DE DESINFECTANTE IDEAL
Actividad microbiana	Debe ser de amplio espectro (bacterias, hongos, virus, esporas)
Solubilidad	Debe ser soluble en agua
Estabilidad	No debe presentar cambios químicos y debe tener una vida útil prolongada
	No debe reaccionar con materia orgánica
No toxicidad	No causar toxicidad a los humanos
Velocidad de reacción	Acción rápida
	Capacidad de penetración celular
Efecto residual	Debe presentar un efecto residual
	Disponibilidad y buena relación costo-riesgo-beneficio
	No debe afectar el medio ambiente

4.3. Mecanismo de acción de los desinfectantes

Estas sustancias usadas en el proceso de desinfección pueden atacar al microorganismo en diferentes puntos: daño en la pared celular causando lisis de la célula, alteración de la permeabilidad de la membrana alterando el intercambio de nutrientes vitales para el microorganismo, alteración de las proteínas e inhibición de ácidos nucleicos y enzimas (14).

La clorhexidina es un compuesto bicationica la cual se une a la pared celular cargada negativamente causando así alteraciones en el balance osmótico, alterando la integridad de la pared bacteriana permitiendo el paso de moléculas propias de la celular hacia el exterior desencadenando la condensación del citoplasma y posteriormente la muerte. A bajas concentraciones se cataloga un agente bacteriostático permitiendo solo la salida de iones de K y P inactivando la célula (15).

La resistencia a desinfectantes puede estar dada por unas propiedades naturales de la célula o por la adquisición de trasposones o plásmidos. Se ha documentado que la resistencia presentada por las bacterias Gram negativas es mayor que la presentada por las Gram positivas. Dentro de los desinfectantes encontramos a los compuestos de amonio cuaternario los cuales han sido los más estudiados en cuanto a resistencia bacteriana se refiere. Éstos son agentes bactericidas especiales contra bacterias Gram positivas y en menor proporción con las Gram negativas. Atacan principalmente la membrana celular, ya que se une a los fosfolípidos y proteínas disminuyendo la permeabilidad (16).

La resistencia presentada por las bacterias frente a éste tipo de desinfectantes está dada por un mecanismo de expulsión del antibiótico mediado por unas bombas que han sido identificadas en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dentro de éste último grupo se encuentran el gen *gacE*, y *gacE-1* (17). Dentro de las bacterias Gram positivas se encuentran los mecanismos identificados como gen *gacA*, *gacB*, *gacH* entre otros, de los cuales se ha descrito que el *gacA*

confiere resistencia al bromuro de etidio a diferencia del *gacH* lo que indica que no todos los sistemas de expulsión de bombas generan la resistencia a los desinfectantes integrante a éste grupo (18).

La producción de radicales de oxígeno es el mecanismo de acción de los desinfectantes oxidantes y peróxidos. Por ejemplo se ha demostrado en *Escherichia coli* que en respuesta al estrés medio ambiental se desarrolla un sistema denominado *oxyR* que resulta de la síntesis de proteínas como catalasa y superóxido dismutasa, cuya función es precisamente prevenir y reparar el daño de los radicales de oxígeno (17). Otro sistema de resistencia se atribuye a la capacidad de la formación de biopelículas donde el componente oxidante se reducirá antes de poder reaccionar con las células, como es el caso de la resistencia frente a peróxido de hidrógeno y cloraminas (19).

Otro grupo de desinfectantes son los fenoles a los cuales se les atribuye la resistencia de *Seudomonas aeruginosa* describiéndose una resistencia fenotípica en conjunto con la disminución de nutrientes. Por otro lado se ha demostrado para micobacterias la resistencia a los glutaraldehídos dada probablemente por el incremento de la hidrofobicidad en la pared celular, aún así no se ha determinado el mecanismo exacto de la resistencia para ninguno de los dos antes mencionados (16).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un diseño experimental donde se identificaron dos aislamientos de cepas con carácter multiresistente frente a antibióticos más usados a nivel hospitalario, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, seleccionadas del stock de muestras de pacientes que presentan infección bacteriana del hospital Universitario San Ignacio,. De estas muestras se evaluará la resistencia o

tolerancia frente a un desinfectante y un antiséptico usados a nivel clínico en dos variables: el tiempo de exposición, la concentración.

Variables de estudio

Las variables son: las cepas bacterianas, clorhexidina al 1% y al 2% mezclada con 61% de alcohol como desinfectante y alcohol glicerinado como antiséptico; el tiempo de exposición y las concentraciones

5.1. MATERIALES

Tubos de ensayo

Erlenmeyer de 100 ml

Pipetas de 10 mL

Pipetas de 1mL

Micropipetas de 100 – 200 µL

Cajas de petri

Asa redonda

Elementos del ensayo

Pseudomonas aeruginosa (multirresistente)

Pseudomonas aeruginosa (sensible)

Klebsiella pneumoniae (multirresistente)

Klebsiella pneumoniae (sensible)

Desinfectante “Clorhexidina” y antiséptico “Alcohol glicerinado”

Medio de cultivo

Agar Trypticase soya TSA

Caldo Trypticase soya

Reactivos

Solución salina

Neutralizante: Caldo Lethen

Agua destilada

Equipos

Baño termostataado

Incubadora

Autoclave

Cronómetro

Vortex

Centrífuga

5.2. Antibiogramas

La determinación de la resistencia frente a los antibióticos más usados a nivel hospitalario fue realizada por el laboratorio del hospital San Ignacio, del cual se obtuvieron las cepas y el reporte de los antibióticos a las que son resistentes.

5.3. Valoración de desinfectantes

5.3.1. Establecimiento de las condiciones experimentales:

Las condiciones experimentales se disponen de acuerdo a la norma técnica colombiana 5473. Se usaron las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, a las cuales se les determinó la resistencia frente a alcohol glicerinado (clean hands) al 68% y clorhexidina 4% donde las condiciones del ensayo se realizaron a una temperatura de 20°C. Adicionalmente se evaluó el tiempo de contacto del desinfectante con la solución del microorganismo entre 0, 1, 2, 4, 8, 16 minutos (20).

Como primera medida se realizaron curvas de crecimiento de cada cepa con el fin de evaluar el comportamiento de las mismas. Para esto se preparó un inóculo en

un erlenmeyer de 100mL (relación 1/2), donde se adicionó una suspensión de 3×10^8 células /mL. Para realizar el crecimiento, se adicionaron 5ml del inóculo con 45ml de medio Trypticase soya donde inmediatamente se tomaron 5mLde muestra correspondiente al tiempo 0. Se incubó a 37°C por 12 horas, con una agitación de 150 rpm. Se realizarán lecturas de la hora 1, 2, 4, 8, 10. Los resultados se expresaron en una curva de crecimiento de absorbancia vs tiempo (ver diagrama de flujo 1)(21).

Por otro lado, se evaluó la resistencia de cada desinfectante en la concentración más alta la cual corresponde a 68% de alcohol glicerinado y 4% de clorhexidina. Éste ensayo se realizó por la técnica de dilución neutralización, donde se mezcló en un tubo 8mL del desinfectante con 2mL del suspensión celular estandarizada al patrón número 2 de Mac Farland, tomando muestra en diferentes tiempos de contacto: (0, 1, 2, 4, 8, 16 min), un tubo para cada tiempo. Al terminar el tiempo de contacto, se tomó una muestra de 2mL y se mezcló con 8mL de caldo Lethen (neutralizante) por 5min. Trascurrido el tiempo se sembró por duplicado en medio TSA por 24 horas para realizar el recuento. Los resultados obtenidos se expresaron mediante curvas de respuesta vs tiempo (ver diagrama de flujo 2)(21).

Adicionalmente se contarán con cepas control que son las mismas especies con carácter sensible a las cuales se les realizará el mismo procedimiento para realizar una curva de susceptibilidad.

Diagrama de flujo 1. Curva de crecimiento de las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

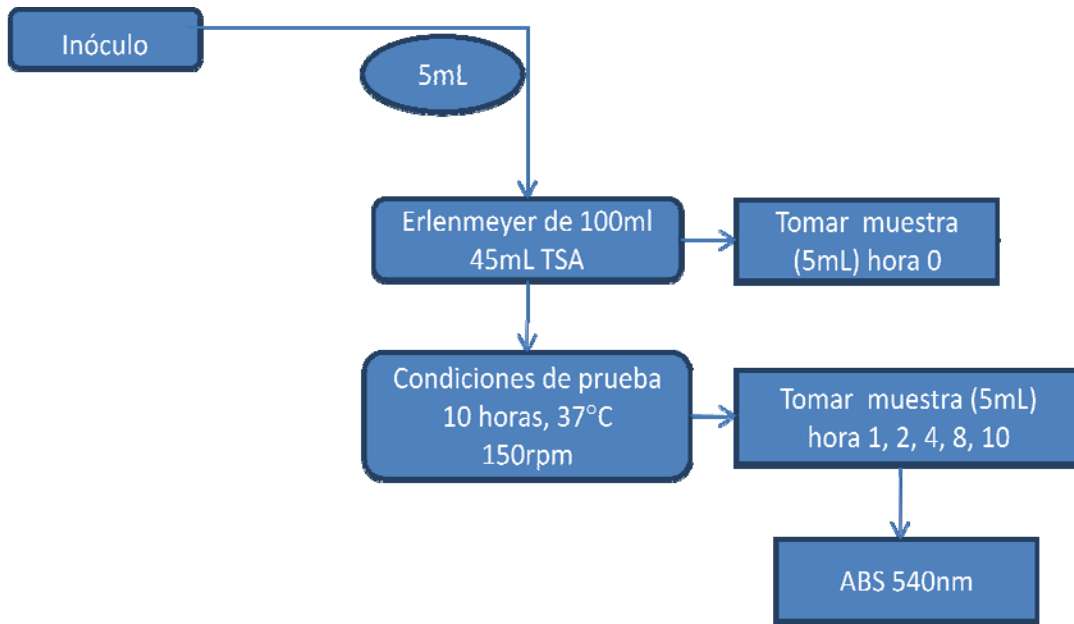
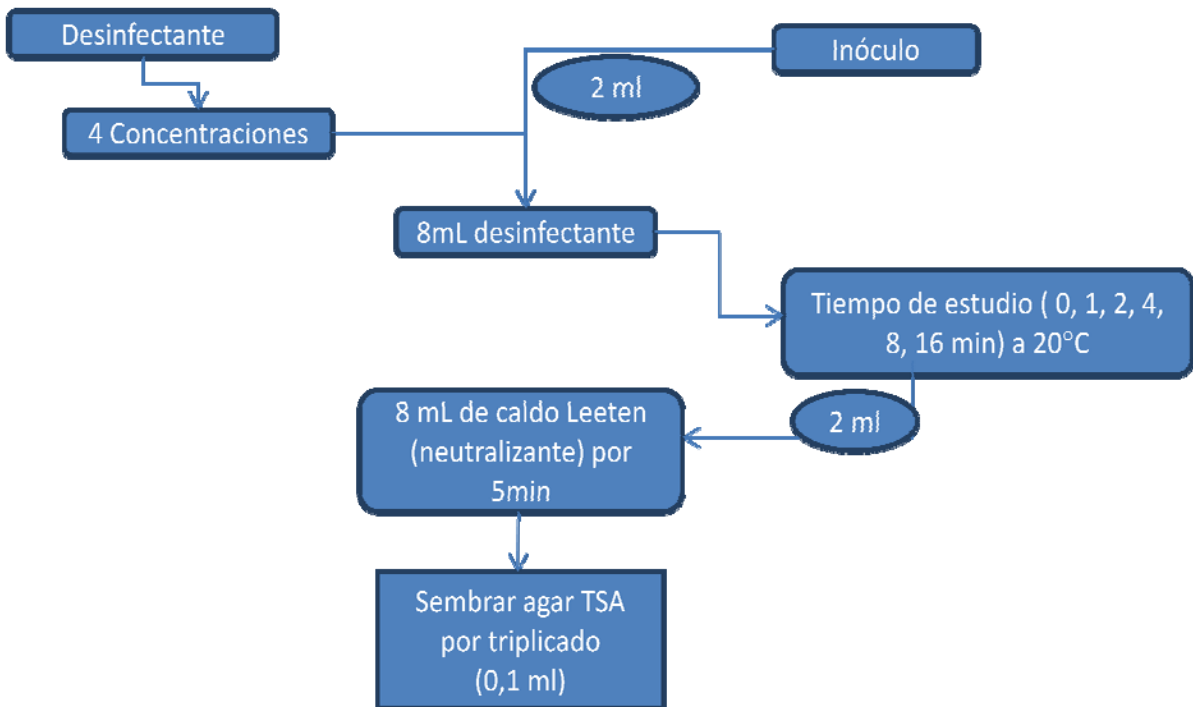


Diagrama de flujo 2. Determinación de resistencia o tolerancia a los desinfectantes



5.4. Análisis de los resultados

De acuerdo a los datos obtenidos en los recuentos por triplicado de cada ensayo, se realizó un promedio de UFC de cada cepa, tanto para el ensayo como para los controles y se efectuó el recuento. Para la interpretación de la resistencia o tolerancia de las cepas frente a los desinfectantes, se realizó una relación entre respuesta vs tiempo los cuales se representaron mediante curvas de crecimiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas evaluadas fueron adquiridas en el hospital San Ignacio provenientes de los aislamientos realizados a muestras de pacientes hospitalizados que presentaron focos infecciosos. Estas cepas demostraron ser de carácter multirresistente a los antibióticos ampliamente usados a nivel clínico; para esto el hospital entregó el reporte del antibiograma. (Ver anexo 1).

Las condiciones experimentales se ajustaron a la norma técnica colombiana 5473. Se establecieron tiempos de contacto de 0, 1, 2, 4, 8, 16 minutos a una temperatura de 21°C.

6.1 Curvas de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la lectura de absorbancias para la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* las cuales se llevaron a cabo en un tiempo de 10 horas. (Ver tabla 1 y 2). Adicionalmente se presentan las curvas de crecimiento ABS vs

Tiempo. (Ver gráfico 1) con el fin de conocer la tendencia de crecimiento de cada cepa.

Tabla 1. Datos obtenidos de la lectura de las absorbancias en la realización de la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

TIEMPO	ABS 1	ABS 2	ABS 3	DIL	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	0,174	0,182	0,171	1	0,176	0,0057	3,237
1	0,185	0,173	0,192	1	0,183	0,0096	5,241
2	0,393	0,354	0,401	1	0,383	0,0251	6,571
4	0,607	0,598	0,602	1	0,602	0,0045	0,749
6	0,552	0,576	0,582	2	0,570	0,0159	2,785
8	0,36	0,398	0,373	2	0,377	0,0193	5,123
10	0,182	0,201	0,194	2	0,192	0,0096	4,996

Tiempo en horas. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

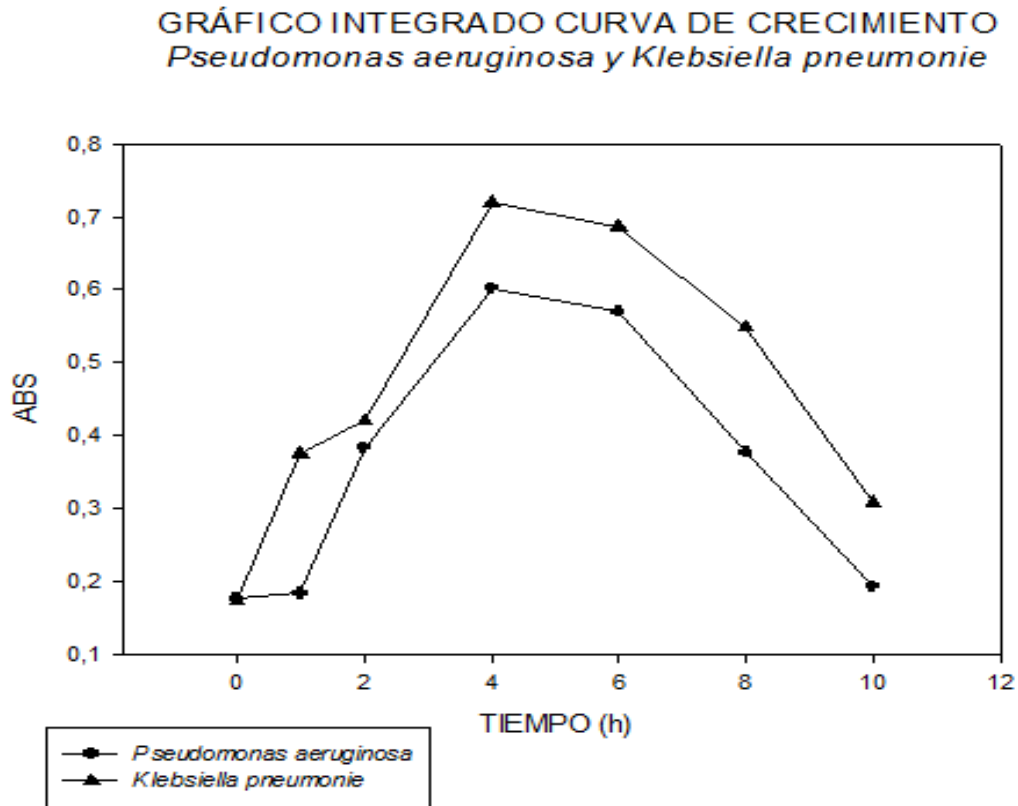
Tabla 2. Datos obtenidos de la lectura de las absorbancias en la realización de la curva de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*.

TIEMPO	ABS 1	ABS 2	ABS 3	DIL	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	0,164	0,172	0,183	1	0,173	0,010	5,514
1	0,362	0,391	0,374	1	0,376	0,015	3,879
2	0,404	0,434	0,423	1	0,420	0,015	3,611
4	0,74	0,698	0,721	1	0,720	0,021	2,922
6	0,698	0,683	0,677	2	0,686	0,011	1,577
8	0,543	0,562	0,54	2	0,548	0,012	2,176
10	0,303	0,325	0,296	2	0,308	0,015	4,913

Tiempo en horas. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

Gráfico 1. Gráfico integrado de curvas de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*



De acuerdo a los resultados expresados en la gráfica se puede observar que para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se evidencia una fase de adaptación entre la hora cero y uno; contrario a lo que se observa con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* donde para el tiempo evaluado no se evidencia una fase adaptativa, lo que sugiere que la asimilación de los diferentes componentes del medio es más rápida favoreciendo su crecimiento en el tiempo. Para evidenciar la fase de adaptación se debería realizar el muestreo en un periodo de tiempo más corto. Por otro lado, para las dos cepas se observa que el pico más alto de su crecimiento se da en un tiempo de cuatro horas, donde se inicia la fase estacionaria hasta la hora seis y desde este tiempo su fase de muerte hacia la hora 10 para el caso de las dos cepas (22). Es importante resaltar que el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en cuanto a la biomasa, fue mayor en relación a la presentada por *Pseudomonas*

aeruginosa razón por la cual se supone que la cepa de *Klebsiella pneumoniae* requiere de menos restricciones o exigencias para su crecimiento en relación con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2 Valoración de resistencia al alcohol glicerinado

Se realizó la determinación de la resistencia presentada por las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antibióticos frente a tres sustancias; clean hands, un antiséptico a base de alcohol glicerinado a una concentración de 68% y dos desinfectantes, uno con una concentración de 1% de clorhexidina y 61% de alcohol, y el segundo de 2% de clorhexidina y 61% de alcohol, aplicando seis tiempos de contacto de estudio. (0, 1, 2, 4, 8 y 16 minutos)

Los datos obtenidos en la evaluación del alcohol glicerinado para *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes se muestran en la tabla 3.1 y 3.2 respectivamente, aplicando los parámetros estadísticos para valorar la reproducibilidad de los datos.

Tabla 3.1. Datos obtenidos en la evaluación de resistencia frente al alcohol glicerinado de *Klebsiella pneumoniae*.

TIEMPO	RECuento 1	RECuento 2	RECuento 3	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	212	223	203	212,7	10,02	4,71
1	184	205	192	193,7	10,60	5,47
2	134	138	143	138,3	4,51	3,26
4	98	101	87	95,3	7,37	7,73
8	84	79	82	81,7	2,52	3,08
16	51	49	62	54,0	7,00	12,96

Tiempo en horas. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

Tabla 3.2. Datos obtenidos en la evaluación de resistencia frente al alcohol glicerinado de *Pseudomonas aeruginosa*

TIEMPO	RECUENTO	RECUENTO	RECUENTO	DIL	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	189	178	191	10 ⁻⁵	186	7,00	3,76
1	103	112	107	10 ⁻⁵	107,33	4,51	4,2
2	81	78	83	10 ⁻³	80,67	2,52	3,12
4	10	12	11	10 ⁻²	11	1,00	9,09
8	0	0	0		0	0,00	
16	0	0	0		0	0,00	

Tiempo en horas. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

Al comparar los resultados de éste estudio con los datos de control, se observó en el tiempo de un minuto, una relación entre la resistencia de las cepas evaluadas frente a los antibióticos, y la resistencia presentada frente a los antisépticos ampliamente utilizados a nivel clínico.

De acuerdo al análisis estadístico de los resultados obtenidos en el recuento de las cepas multirresistentes, el coeficiente de variación presentó un valor inferior al 10% a excepción del tiempo 16 en el recuento de la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo se generó confiabilidad en la reproducibilidad de los datos. Adicionalmente, se observó una reducción poblacional en los dos casos, sin embargo se evidenció una resistencia frente al alcohol glicerinado por parte de *Klebsiella pneumoniae*, presentando crecimiento en 16 minutos de contacto. Por otro lado, en el tiempo de 4 minutos *Pseudomonas aeruginosa*, presentó tolerancia, no obstante, no logró desarrollarse en el tiempo de 8 minutos, indicando así la acción bactericida del antiséptico.

El hallazgo de cepas multirresistentes de especies *Klebsiella* y *Pseudomonas* ha aumentado en los últimos años presentándose en un 80%, complicando así el cuadro clínico de los pacientes hospitalizados (24).

La resistencia presentada frente a éste antiséptico se relaciona directamente con el carácter multirresistente de las cepas evaluadas. Los resultados del antibiograma de *Klebsiella pneumoniae* determina la resistencia frente a cinco grupos de antibióticos, aminoglucósidos, B-lactámicos, cefalosporinas de primera, segunda, tercera generación, carbapenems, quinolonas y sulfonamidas. (Ver anexo 1).

La resistencia presentada por las bacterias Gram negativas se describe principalmente por la producción de enzimas beta lactamasas incluyendo la pérdida o modificación de porinas disminuyendo así la permeabilidad de la membrana (13). La producción de enzimas capaces de hidrolizar los carbapenems, metilasas, acetil-transferasas, nucleotidil- transferasas y fosfotransferasas que inactivan, especialmente, los aminoglucósidos y bombas de expulsión capaces de conferir resistencia frente a las quinolonas. Estos factores contribuyen al aumento de la resistencia frente a los agentes usados como desinfectantes (13).

Con el propósito de conocer la resistencia de éstas cepas frente al antiséptico clean hands se realizó una gráfica integrada de respuesta, representada en log 10 de UFC/mL vs tiempo cuyos datos se muestran en la tabla 4.

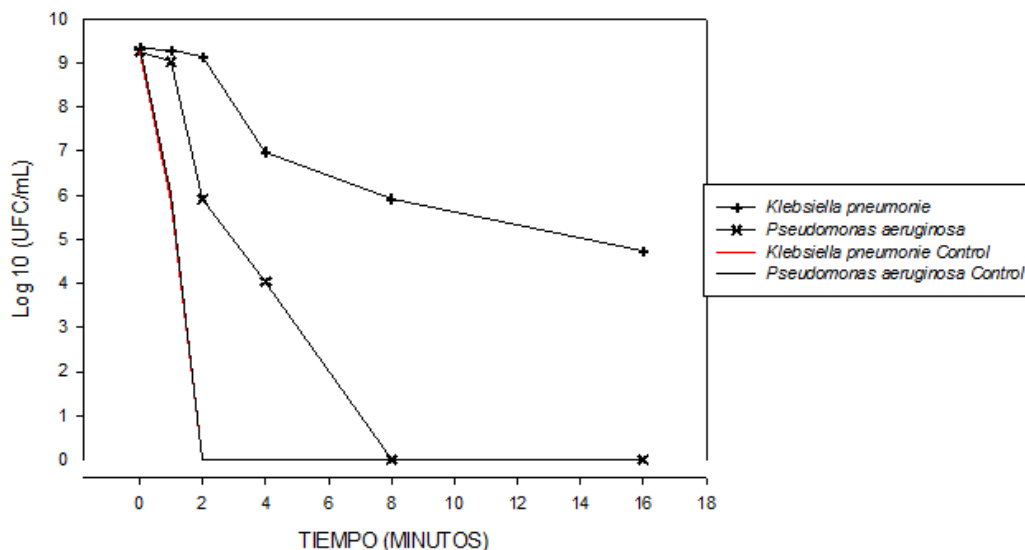
Tabla 4. Recuento de UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* de cepas control (sensibles) y resistentes.

<i>Pseudomonas aeruginosa control</i>					<i>Klebsiella pneumonie control</i>				
TIEMPO	DIL	PROMEDIO	UFC / mL	log 10	TIEMPO	DIL	PROMEDIO	UFC / mL	log 10
0	10 ⁻⁶	234	2,34E+09	9,37	0	10 ⁻⁶	187	1,87E+09	9,27
1	10 ⁻³	104	1,04E+06	6,02	1	10 ⁻³	72	7,20E+05	5,86
2		0	0	0,00	2		0	0	0
4		0	0	0,00	4		0	0	0
8		0	0	0,00	8		0	0	0
16		0	0	0,00	16		0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					<i>Klebsiella pneumonie</i>				
0	10 ⁻⁶	186,0	1,86E+09	9,27	0	10 ⁻⁶	213	2,13E+09	9,33
1	10 ⁻⁶	107,0	1,07E+09	9,029	1	10 ⁻⁶	194	1,94E+09	9,29
2	10 ⁻³	81,0	8,10E+05	5,908	2	10 ⁻⁶	139	1,39E+09	9,14
4	10 ⁻²	11,0	1,10E+04	4,041	4	10 ⁻⁴	95	9,50E+06	6,98
8		0,0	0,00	0	8	10 ⁻³	82	8,20E+05	5,91
16		0,0	0,00	0	16	10 ⁻²	54	5,40E+04	4,73

Tiempo en minutos. DIL: dilución.
 UFC: unidades formadoras de colonias

Gráfico 2. Gráfico integrado de respuesta vs tiempo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumonie* frente al alcohol glicerinado “clean hands”

GRÁFICO INTEGRADO
 RESPUESTA VS TIEMPO FRENTE AL ALCOHOL GLICERINADO
 AL 68% DE LAS CEPAS EVALUADAS



La resistencia presentada por las bacterias Gram negativas se ha descrito a razón de caracteres intrínsecos como la composición de la pared que contribuye a la disminución de la permeabilidad de la membrana, o por presencia de bombas de expulsión que se encargan de expulsar fuera de la célula los agentes biocidas incluyendo entre ellos desinfectantes o antibióticos. Por otro lado se describe la resistencia adquirida la cual se basa en la mutación o adquisición de genes de resistencia en forma de plásmidos o transposones (25)(26).

6.3 Valoración de la resistencia frente a las dos concentraciones de clorhexidina

Los datos obtenidos en la valoración de resistencia o tolerancia frente al segundo desinfectante cuya concentración se encontraba al 1% de clorhexidina y 61% de alcohol para *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* se muestran en la tabla 6.1 y 6.2 respectivamente. Adicionalmente se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de la clorhexidina a la concentración de 2% en la tabla 7.1 y 7.2.

Tabla 6.1. Datos obtenidos en la evaluación de resistencia frente a la clorhexidina al 1% y alcohol 61% de *Klebsiella pneumoniae*.

<i>Klebsiella pneumoniae control</i>							
TIEMPO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3	DIL	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	198	191	202	10 ⁻²	197,0	5,57	2,83
1	0	0	0		0,0	0,00	0,00
2	0	0	0		0,0	0,00	0,00
4	0	0	0		0,0	0,00	0,00
8	0	0	0		0,0	0,00	0,00
16	0	0	0		0,0	0,00	0,00
<i>Klebsiella pneumoniae resistente</i>							
0	184	201	193	10 ⁻²	192,7	8,50	4,41
1	53	49	61	10 ⁻²	54,3	6,11	11,25
2	0	0	0		0,0	0,00	0,00
4	0	0	0		0,0	0,00	0,00
8	0	0	0		0,0	0,00	0,00
16	0	0	0		0,0	0,00	0,00

Tiempo en minutos. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

Tabla 6.2. Datos obtenidos en la evaluación de resistencia frente a la clorhexidina al 2% y alcohol 61% de *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>Pseudomonas aeruginosa control</i>							
TIEMPO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3	DIL	PROMEDIO	DESVEST	% CV
0	213	198	205	10 ⁻²	205,3	7,51	3,66
1	0	0	0		0,0	0,00	0,00
2	0	0	0		0,0	0,00	0,00
4	0	0	0		0,0	0,00	0,00
8	0	0	0		0,0	0,00	0,00
16	0	0	0		0,0	0,00	0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa resistente</i>							
0	203	210	199	10 ⁻²	204,0	5,57	2,73
1	110	103	109	10 ⁻²	107,3	3,79	3,53
2	54	48	49	10 ⁻²	50,3	3,21	6,39
4	0	0	0		0,0	0,00	0,00
8	0	0	0		0,0	0,00	0,00
16	0	0	0		0,0	0,00	0,00

Tiempo en minutos. ABS: absorbancia. DIL: dilución.

Desvest: desviación estándar. %CV: porcentaje coeficiente de variación

El comportamiento de los datos en el recuento tanto para el control como para el ensayo genera un nivel óptimo de confiabilidad, ya que la reproducibilidad de los datos no sobrepasa el 12% de variación. Aun así se debe tener en cuenta que las cepas control en contacto con el desinfectante se inactivan desde el tiempo de 1 minuto. Esto sugiere que en el caso de *Klebsiella pneumoniae* se presenta una mínima resistencia frente a la clorhexidina reduciendo a más de la mitad su concentración celular en el tiempo 1 e inhibiéndola a partir de dos minutos de contacto. Para el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* se observa un crecimiento hasta el tiempo de dos minutos, lo que sugiere una resistencia mayor frente a éste desinfectante en comparación con la *Klebsiella pneumoniae*.

De acuerdo a lo anterior la resistencia de las bacterias, especialmente las Gram negativas, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* sp. entre otros, frente a agentes desinfectantes ha aumentado en los últimos años. (27). La clorhexidina es un agente catiónico el cual se une a la pared bacteriana cargada negativamente. Éste compuesto tiene la capacidad de afectar el equilibrio osmótico facilitando la liberación de sustancias intracelulares, produciendo precipitación del citoplasma. La resistencia presentada por *Pseudomonas aeruginosa* se basa en la composición del lipopolisacárido y el contenido de iones de magnesio en la membrana, reduciendo la carga negativa de la pared y así mismo reduciendo la unión de la clorhexidina.

En la siguiente tabla se muestra el recuento realizado de cada tiempo. (ver tabla 7 y 8) A estos datos se les determinó log 10, para graficar una curva de respuesta vs tiempo, tanto de las cepas evaluadas como las control. Además se realizó la gráfica integrada de respuesta vs tiempo. (ver gráfico 3)

Tabla 7. Recuento de UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y controles frente a la clorhexidina al 1% alcohol 61%

<i>Klebsiella pneumoniae control</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa control</i>			
TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10	TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10
0	10 ⁻²	1,98E+05	5,30	0	10 ⁻²	2,05E+05	5,31
1		0,00	0,00	1		0	0
2		0	0,00	2		0	0
4		0	0,00	4		0	0
8		0	0,00	8		0	0
16		0	0,00	16		0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10	TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10
0	10 ⁻²	1,93E+05	5,29	0	10 ⁻²	2,04E+05	5,31
1	10 ⁻²	5,40E+04	4,73	1	10 ⁻²	1,07E+05	5,03
2		0	0,00	2	10 ⁻²	5,00E+04	4,70
4		0	0,00	4		0	0
8		0	0,00	8		0	0
16		0	0,00	16		0	0

Tiempo en minutos. DIL: dilución.

UFC: unidades formadoras de colonias

Tabla 8. Recuento de UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes y controles frente a la clorhexidina al 2% alcohol 61%

<i>Klebsiella pneumoniae control</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa control</i>			
TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10	TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10
0	10 ⁻²	2,07E+05	5,32	0	10 ⁻²	2,05E+05	5,31
1		0,00	0,00	1		0	0
2		0	0,00	2		0	0
4		0	0,00	4		0	0
8		0	0,00	8		0	0
16		0	0,00	16		0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10	TIEMPO	DIL	UFC / mL	log 10
0	10 ⁻²	2,14E+05	5,33	0	10 ⁻²	1,99E+05	5,30
1		0	0,00	1	10 ⁻²	7,20E+04	4,86
2		0	0,00	2	10 ⁻²	1,60E+04	4,20
4		0	0,00	4		0	0
8		0	0,00	8		0	0
16		0	0,00	16		0	0

Tiempo en minutos. DIL: dilución.

UFC: unidades formadoras de colonias

Gráfico 3. Gráfico integrado de respuesta vs tiempo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* frente a la clorhexidina al 1% alcohol 61%

GRAFICO INTEGRADO
 RESPUESTA VS TIEMPO FRENTE CLORHEXIDINA
 1% Y ALCOHOL 61%

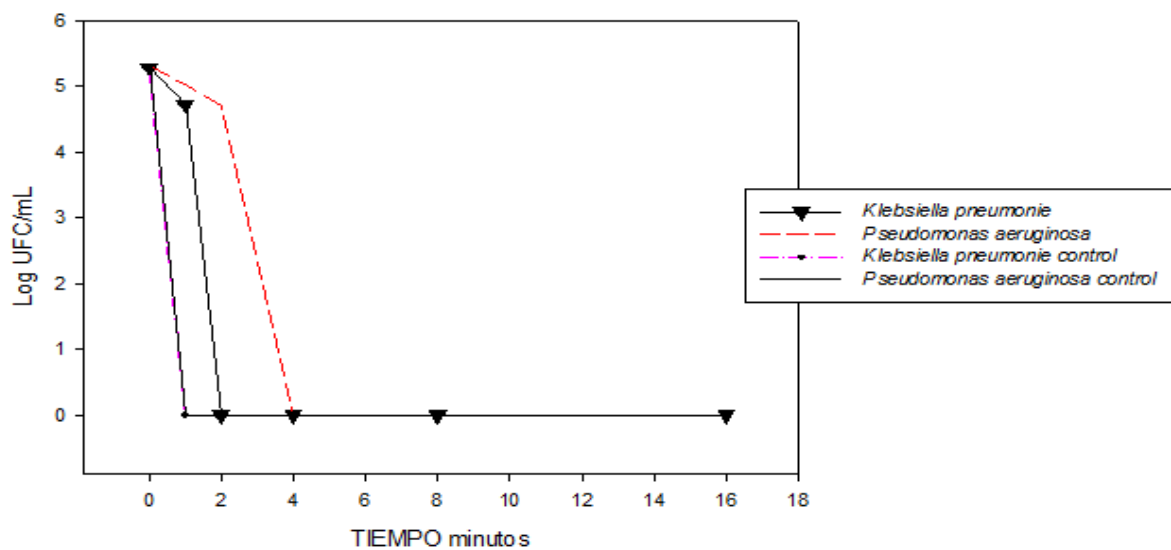
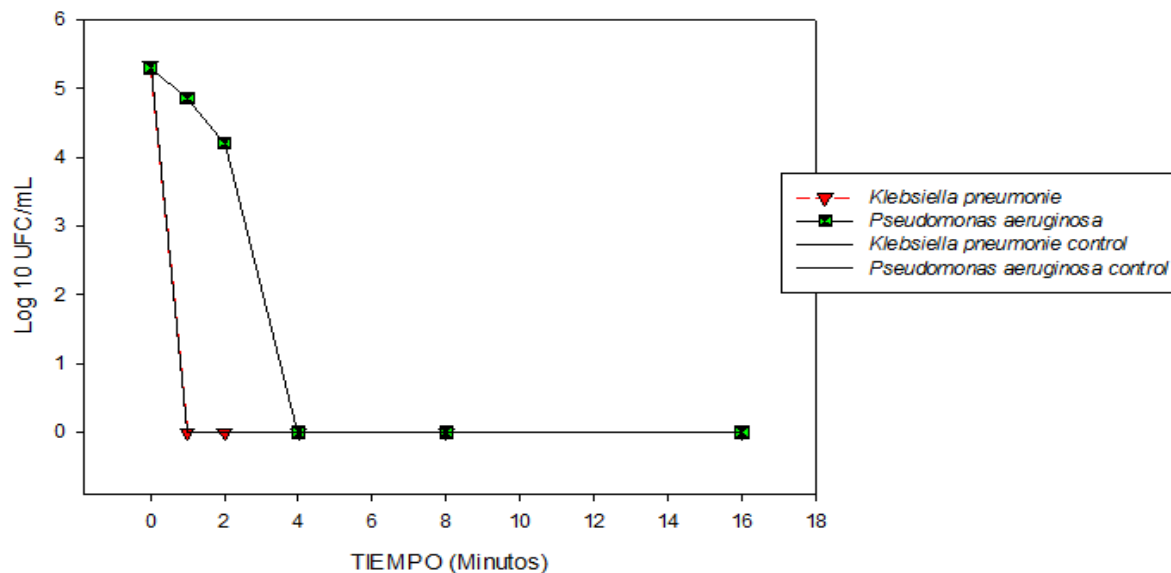


Gráfico 4. Gráfico integrado de respuesta vs tiempo de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* frente a la clorhexidina al 2% alcohol 61%

GRÁFICO INTEGRADO
 RESPUESTA VS TIEMPO FRENTE A CLORHEXIDINA
 2% Y ALCOHOL 61%



En comparación con el estudio realizado por Koljalg et al. Se evidencia que se encuentra una mayor resistencia frente a la clorhexidina por parte de bacterias Gram negativas. Lo que se relaciona con la mayor prevalencia en la identificación microbiana de muestras provenientes de infecciones nosocomiales (27). Adicionalmente se establece que el carácter multirresistente se relaciona directamente con la resistencia frente a éste desinfectante, que aunque son molecularmente diferentes, actúan en la pared celular interfiriendo en la permeabilidad de la membrana como los beta lactámicos como cefalosporinas o aminoglucósidos. Dichos mecanismos de resistencia se deben principalmente por el contenido de bombas de expulsión, secreción de enzimas capaces de degradar el desinfectante o por el cambio en los componentes de la membrana en bacterias Gram negativas de fosfolípidos por ácidos grasos o lípidos neutros (28).

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados observados en la evaluación de las cepas multirresistentes frente a los agentes desinfectantes, se puede concluir que las dos cepas, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* presentan resistencia frente al alcohol glicerinado lo que obliga a, si no a una mejora en la fórmula del antiséptico, sí a un aumento en el tiempo de contacto para asegurar la inhibición bacteriana. Adicionalmente se concluye que para *Klebsiella pneumoniae* el desinfectante de clorhexidina al 2% inhibe por completo el crecimiento bacteriano. Por el contrario, aún con la concentración de clorhexidina al 2% se presenta crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, con un recuento menor en comparación con la concentración de clorhexidina al 1%.

La resistencia adquirida por las bacterias Gram negativas frente a los antibióticos ampliamente usados a nivel clínico se relaciona directamente con la resistencia presentada frente a los agentes desinfectantes más usados. Es de entenderse que el mal uso de los antibióticos y las mutaciones genéticas entre las bacterias aumenta la ineficiencia de los antimicrobianos y la presencia de bacterias multirresistentes en las instalaciones médicas. Así pues, los desinfectantes y antisépticos, sin la valoración de resistencia contribuyen al aumento y a la ineficaz erradicación de las cepas bacterianas.

8. RECOMENDACIONES

Al analizar la situación que se presenta en el país con el aumento de la resistencia frente a antibióticos, y a falta de uso prudente de los antibióticos, se recomienda realizar un estudio estadístico de la frecuencia en la aparición de cepas bacterianas de las superficies del área de hospitalizados o de cuidados intensivos que pueden ser causantes de infecciones nosocomiales. Esto con el fin de reevaluar la eficacia de los protocolos de desinfección que en teoría debería erradicar éstas cepas en el menor tiempo de contacto.

Adicionalmente se recomienda realizar el mismo procedimiento del presente trabajo con por lo menos tres cepas multirresistentes de las especies de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que éstas aparentan ser más comunes en los aislamientos de pacientes cateterizados con estancia en la unidad de cuidados intensivos. Dentro del estudio se puede incluir otras cepas como *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*.

Se recomienda también realizar la evaluación de eficiencia y resistencia frente a cepas de carácter resistente, de diferentes productos terminados a base de alcohol glicerinado.

9. BIBLIOGRAFÍA:

1. Cabrera C. Gomez R. Zuñiga 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
2. Contreras L. Fica A. Figueroa O. Enrriquez N. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y su asociación con factores clínicos y epidemiológicos. *Revista médica de Chile*. 2002: 0034-9887
3. Russell. A. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The lancet infectious diseases*. 2003; 3:794-803
4. Tenover Fred. Mechanisms o antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. Estados Unidos. Volume 119. 2006.
5. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*. New York. 1992
6. Manus Mc. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health system Pharm*. 1997. 1420-1433.
7. Conejo M. Garcia I. Martinez L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases oprd expression, causing carbapenem resistance I *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents chemother*. 2003. 2313-2315
8. Clive P. Curtis M. Sutter M. Hoffman B. *Farmacología integrada*. Edición. Harcourt. Madrid. España. 1998
9. Livermore David. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995. 0893-8512
10. Barcelona Laura, Marin Marcelo, Stambouliau Daniel. Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas Amoxicilina sulbactam. *Fundación centro de estudios infectológico*. 2008. 68: 65-74.
11. Enne V et al. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53. 2003-3007
12. Scott k. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. *The new england journal of medicine*. 2005; 352:1436-44.

13. Tafur Jose, Torres Julian, Villegas María. Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias gram negativas. *Revista scielo. Centro internacional de investigaciones médicas.* 2008. 0123- 9192
14. Fraise A. choosing disinfectants. *Journal of hospital infection.* 1999; 43: 255-264
15. Torres M. Diaz M. Acosta A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *Clínica Estomatológica Provincial Docente. Sancti Spíritus.* 2009; 11
16. Vega R. Uran M. Molina N. Garzón L. *Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias.* Primera edición. Secretaría de salud. Esfera editores Ltda. Colombia. 2004
17. Sanchez L. Saenz E. Antisépticos y desinfectantes. *Revista de dermatología peruana.* 2005; (2): 1-22
18. Chapman John. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2003; 53: 271 – 276
19. Heir E. Sundheim G. Holck A. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of Applied Microbiology.* 1999; 86: 378–388.
20. Demple B. Redox signaling and gene control in the Escherichia coli soxRS oxidative stress regulon—a review. *Gene.* 1996; 179: 53–57.
21. ICONTEC NTC 5473. Desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los desinfectantes químicos para instrumental utilizado en el sector salud. Método de ensayo y requisitos. 2007
22. Carrascal A. *Manual de laboratorio: Microbiología de alimentos.* Primera edición. Centro editorial javeriano CEJA. Bogotá. Colombia. Pag 166-167
23. Cochran W. McFeters G. Stewart P. Reduced susceptibility of thin Pseudomonas aeruginosa biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology .* 2000; 88: 22–30.

24. Coyle Marie. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. <http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/04.pdf>. consultado el día 15 de Noviembre del 2010
25. De la parte M. Brito A. Guzman M. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos en Venezuela. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología*. 2001; 21:2
26. Russell A. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of hospital infection*. 2004; 57: 97-104
27. Russell A. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of applied Microbiology*. 1997; 82:155-166
28. Morató J. Microbial response to disinfectants. *Water and Wastewater Microbiology*. 2003.
29. Walsh S. Maillard J. Russell A. Catrenich C. Bartolo R. Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. 2003; 55: 98-107
30. Germany D. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998; 41:225-234

10. ANEXO 1

ANTIBIOGRAMA 1

GERMEN IDENTIFICADO		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Antimicrobiano	CIM	Interpretación
Amicacina	>32	R
Amox/A clav	>16	R
Aztreonam	>16	R
Cefazolina	>16	R
Cefepima	>16	R
Cefotaxima	>32	R
Ceftazidima	>16	R
Ceftriaxona	>32	R
Cefuroxima	>16	R
Ciprofloxacina	>2	R
Ertapenem	>4	R
Gentamicina	>8	R
Imipenem	>8	R
Levofloxacina	>4	R
Meropenem	>8	R
Tetraciclina	≤4	S
Trimet/sulfa	>2	R

ANTIBIOGRAMA 2

GERMEN IDENTIFICADO		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Antimicrobiano	CIM	Interpretación
Amicacina	≤8	S
Aztreonam	>16	R
Cefepima	≤8	S
Ceftriaxona	>32	R
Ciprofloxacina	≤1	S
Gentamicina	≤4	S
Imipenem	>8	R
Levofloxacina	≤2	S
Meropenem	>8	R
Tetraciclina	>8	R