



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE  
QUIMICOFARMACOBIOLOGIA

“EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A BIOCIDAS EN  
BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO  
DE QUIMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

DENNIS EMMANUEL GONZALEZ JARAMILLO

ASESORES:

QFB SANDRA MARIA SUAREZ MORENO  
QFB JUAN MANUEL BARAJAS MAGALLON

MORELIA, MICHOACAN

DICIEMBRE 2007

# INDICE

**Agradecimientos**

**Dedicatoria**

**Resumen**

Página

## **I.-Antecedentes**

1.1 Reseña histórica.....	1
1.2 Generalidades de un agente biocida.....	2
1.3 Mecanismos de acción biocida.....	7
1.3.1 Alcoholes.....	8
1.3.2 Aldehídos.....	9
1.3.3 Agentes liberadores de Cloro.....	10
1.3.4 Yodo y yodóforos.....	12
1.3.5 Compuestos de Amonio cuaternario.....	12
1.3.6 Peróxido de Hidrógeno.....	14
1.3.7 Agua superoxidada.....	15
1.4 Mecanismos de resistencia.....	16
1.4.1 Mecanismos de resistencia bacterianos intrínsecos.....	17
1.4.2 Mecanismos de resistencia bacterianos adquiridos.....	26
1.4.3 Mecanismos de resistencia fúngica.....	30

**II.- Justificación.....**33

**III.- Hipótesis.....**35

**IV.- Objetivos.....**36

**V.- Metodología.....**37

**VI.- Resultados.....**41

**VII.- Discusión.....**51

**VIII.- Conclusión.....**53

**IX.- Recomendaciones.....**54

**X.- Referencias bibliográficas.....**55

# AGRADECIMIENTOS

A DIOS por estar siempre a mi lado, darme la paciencia y fortaleza para permitirme alcanzar una meta más en mi vida.

A mis asesores el QFB. Juan Manuel Barajas Magallón y la QFB. Sandra María Suárez Moreno por darme la oportunidad y brindarme la confianza, su valioso tiempo y el apoyo necesario para realizar el presente trabajo; por desarrollar en mí el interés hacia la investigación y con ello lograr un paso hacia delante en mi formación profesional.

A mis maestros y revisores: D. C. Carlos Cervantes Vega, QFB. María Rebeca Tinoco Martínez y al Dr. José Luís Martínez Toledo por su valiosa colaboración para hacer de este un mejor trabajo de investigación.

Al grupo de químicas: Guadalupe Bolaños Monroy, Argelia Vega Cazares, María Elena Vargas Arévalo y al Biólogo Juan Luís Jaime Sánchez, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia profesional en el área de microbiología así como por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

A las químicas del área de Parasitología: Lilia Altamirano Rojas, Guadalupe Eréndira Orozco Mosqueda y Cecilia García Ruiz de Chávez; por su apoyo incondicional y compartir conmigo sus experiencias profesionales durante mi estancia en el laboratorio.

Especialmente a la QFB. Laura Karina Avilés Benítez por su valioso tiempo, amistad incondicional y por compartir conmigo su experiencia académica y profesional desde el primer instante de mi paso por el Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia.

A los integrantes de la Unidad Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica por su colaboración en el presente trabajo.

# DEDICATORIA

## **A MIS PADRES:**

Anabella y Alberto Basilio, como señal de eterno agradecimiento; porque con su inmenso amor y gran apoyo incondicional forjaron en mí el interés por superarme y alcanzar mis ideales.

## **A MI TIO:**

Martín, en señal de agradecimiento por todo su apoyo incondicional, la confianza y compañía durante estos 6 años, para hacer de este sueño una realidad que ahora significa un logro que también le pertenece.

## **A MIS HERMANOS:**

Oyuki Jokabed, Miguel Ángel y Alan Alberto, como muestra de gratitud por su apoyo incondicional, amor y compañía.

## **A MIS ABUELOS:**

Virginia y José; Alberto <sup>(†)</sup> y Zenaida, porque gracias a ustedes tengo los mejores padres.

## **A MIS AMIGOS:**

Kary, Lily, Lulú, Isabel, Paco, Jezabel y Alejandro en señal de la gran amistad que nos ha mantenido unidos durante el tiempo que tengo de conocerlos y por permitirme ser parte de ustedes.

# RESUMEN

Los biocidas (antisépticos y desinfectantes) son agentes antimicrobianos importantes dentro de las actividades para el control de las infecciones nosocomiales. Después de la revolución terapéutica que acompañó a la introducción de los antibióticos en la medicina estos agentes fueron olvidados; sin embargo, la aparición de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos y el surgimiento de enfermedades infecciosas para las cuales las opciones terapéuticas son limitadas promovieron el desarrollo de los programas para el control de las infecciones nosocomiales y con ello, la importancia de estos agentes.

La resistencia a los biocidas se ha reportado desde 1960 y se considera que ha ido en aumento. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de resistencia en bacterias causantes de infección nosocomial a los biocidas utilizados comúnmente en las prácticas de antisepsia y desinfección en el Hospital Infantil de Morelia.

Mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de siete biocidas diferentes se valoró la resistencia en bacterias y levaduras aisladas de casos de infección nosocomial (IN). Utilizando la prueba  $\chi^2$  (ji cuadrada), se demostró una significancia estadística en los resultados obtenidos dejando entrever que algunos biocidas como el glutaraldehído y el cloro (ampliamente utilizados en la desinfección de instrumental médico y mobiliario del hospital) han generado que los microorganismos intrahospitalarios tengan resistencia mayor que las cepas ATCC (American Type Collection Culture) equivalentes, frente a dichos agentes antimicrobianos. Esto es importante ya que abre la posibilidad de que estos microorganismos no sean eliminados totalmente durante las prácticas de antisepsia y desinfección y, por lo tanto, propicie su diseminación en el hospital con el consecuente aumento en el riesgo de adquirir una infección nosocomial.



## I.- ANTECEDENTES

### 1.1.- RESEÑA HISTÓRICA

Desde el principio de la historia escrita, las personas han utilizado métodos de desinfección y esterilización, aunque durante mucho tiempo no se sospechó de la existencia de los microorganismos. Los egipcios empleaban el fuego para esterilizar el material infeccioso, y desinfectantes para embalsamar los cuerpos; mientras que los griegos quemaban azufre para fumigar los edificios. La ley de Moisés obligaba a los hebreos a quemar todas las ropas de los que morían de lepra. <sup>(1)</sup>

John Pringle parece ser el primero en utilizar el término antiséptico en 1750 para describir a las sustancias que previenen la putrefacción. Numerosas sustancias químicas han sido utilizadas para su aplicación sobre la piel con el fin de evitar las infecciones. Sin embargo, fue hasta el siglo XIX y primeros años del XX que los biocidas comenzaron a usarse en la medicina, pero sus agentes antecesores no fueron aceptados en las publicaciones de Pasteur, sino hasta 1863, cuando se reconoció el origen microbioal de la putrefacción. <sup>(2,3)</sup>

A principios de siglo XIX Semmelweis y Nightingale<sup>(2,5)</sup> hicieron notorios descubrimientos en la antisepsia, con la introducción del lavado de manos empleando compuestos clorados obtuvieron una importante reducción de la morbimortalidad por infecciones hospitalarias.

Joseph Lister, años después introduce los principios de la antisepsia en cirugía. Amplió el uso a soluciones fenólicas, tanto para el lavado de manos como para el lavado de la piel de los pacientes, de la ropa e instrumental quirúrgico. Estos hallazgos generaron un impacto importante en la prevención de las infecciones nosocomiales, y abrieron el camino para el gran avance de la cirugía. <sup>(1,2,13,15)</sup>

La introducción de los antibióticos en medicina, hizo que los biocidas (antisépticos y desinfectantes) fueran olvidados y temporalmente permanecieran en la sombra. Sin embargo, la aparición en las últimas décadas de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, las nuevas patologías fúngicas y víricas, hizo reevaluar los métodos preventivos que reducen el riesgo de adquirir las infecciones. Con ello los



biocidas volvieron a adquirir importancia, no solo en medicina, sino también en otros campos como el veterinario, el industrial y en la conservación de los alimentos. <sup>(3)</sup>

## 1.2.- GENERALIDADES DE UN AGENTE BIOCIDA

El control bacteriano es importante en la práctica médica y este se basa en la eliminación de las bacterias o la inhibición de su crecimiento mediante procedimientos físicos, agentes químicos o farmacológicos. Los principales procedimientos para controlar el crecimiento de los microorganismos se basan en la prevención de la contaminación y el control de la proliferación de agentes patógenos, medidas que además ayudan a reducir los costos a las instituciones. <sup>(4)</sup>

Los agentes químicos antimicrobianos utilizados para el control microbiológico se denominan *biocidas*. En general, poseen un espectro de actividad más amplio que los antibióticos, ya que tienen múltiples sitios blanco al afectar a diversos componentes celulares. <sup>(10,14)</sup>

Son *desinfectantes* cuando se utilizan en solución de alta concentración, durante periodos cortos sobre objetos inanimados o superficies; mientras que, a una baja concentración y aplicados sobre tejido vivo (generalmente en la piel) se denominan *antisépticos*. <sup>(3,7,9,10,14)</sup>

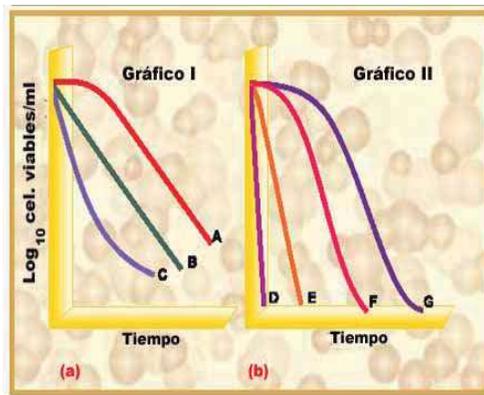
No todas las propiedades que debería poseer idealmente un biocida las cumplen todos los productos; además, éstas pueden variar dependiendo de su uso. El antiséptico-desinfectante ideal debe tener ciertas características <sup>(1,2,3,7,16)</sup>, entre ellas:

- \*Tóxico para los agentes infecciosos; pero, no causar daño al huésped o al objeto inanimado sobre el cual se va a ejercer el efecto.
- \*No absorberse a través de la piel o las mucosas o, por lo menos, esta absorción debe ser mínima para evitarse toxicidad sistémica.
- \* Elevada potencia a baja concentración.
- \*Altamente estable, la estructura química del agente debe ser tal que resista diversas condiciones.
- \*Amplio espectro, debe tener acción sobre todo tipo de microorganismos, en diluciones elevadas y en presencia de materia orgánica.



- \*Soluble en agua y lípidos para poder penetrar en los microorganismos.
- \*Una tensión superficial baja, de manera que pueda entrar en grietas de superficies.
- \*Rápida acción microbicida, debe lograrse en segundos-minutos después de su aplicación.
- \*Bajo costo.

Una población microbiana no se destruye instantáneamente cuando se expone a un agente letal. La muerte de una población microbiana por acción de agentes químicos (figura 1), al igual que su crecimiento, es generalmente exponencial o logarítmica; es decir, la población se reduce en niveles iguales a intervalos constantes. Cuando la población se ha reducido notablemente, la velocidad de destrucción disminuye debido a la supervivencia de los microorganismos más resistentes. (1,11)

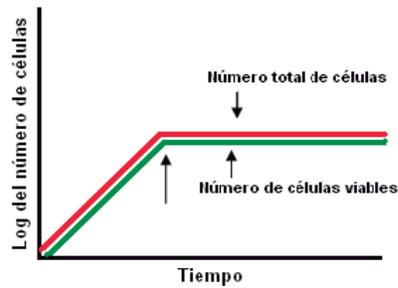


**Figura 1.** Curvas de sobrevivencia en una suspensión bacteriana expuesta a desinfectante.

a) Respuestas bacterianas: A inicio seguido de muerte exponencial. B muerte exponencial. C muerte exponencial seguida por curva de crecimiento. b) Efecto de diferentes concentraciones de fenol activo vs *E. coli*, D concentración más alta, G es la más baja). A muy baja concentración se produce una curva sigmoideal, que se va pronunciando menos a medida que la concentración aumenta, formando una línea recta que corresponde a la concentración más alta. (Ref. 8)

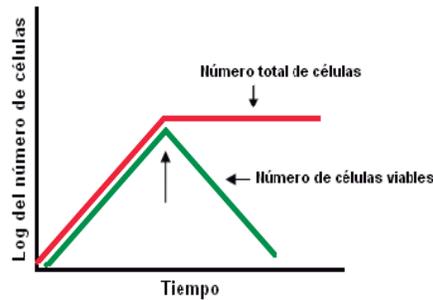
Se observan tres diferentes efectos cuando se añade un agente químico antimicrobiano a un cultivo en fase exponencial de crecimiento (6):

**ESTATICO.** Cuando se inhibe el crecimiento bacteriano, pero las células no mueren (figura 2). Con frecuencia los agentes estáticos solo inhiben la síntesis de proteínas al unirse a los ribosomas; esta unión no es fuerte y, cuando disminuye la concentración del agente, el microorganismo reanuda el crecimiento.



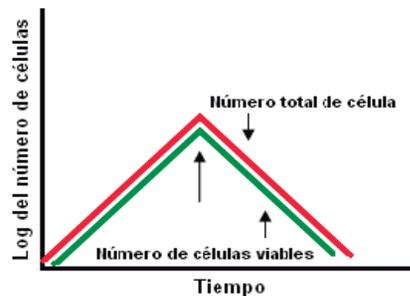
**Figura 2.** Efecto estático de un desinfectante sobre un cultivo bacteriano en crecimiento. La flecha marca el tiempo en que se añade el desinfectante al cultivo. (Ref. 6)

**CIDA.** Mata a las células, pero no da lugar a la lisis o ruptura de las células (figura 3). Generalmente esta clase de agentes, se unen fuertemente a sus sitios blancos de manera permanente y no se eliminan por dilución.



**Figura 3.** Efecto cida de un desinfectante sobre un cultivo bacteriano en crecimiento. La flecha marca el tiempo en que se añade el desinfectante al cultivo. (Ref. 6)

**LITICO.** Estos agentes provocan la muerte microbiana y lisan las células; observándose después de añadir el agente (figura 4), un descenso en el número de células o en la turbidez. Entre otros, se encuentran los agentes que lesionan la membrana citoplasmática.



**Figura 4.** Efecto lítico de un desinfectante sobre un cultivo bacteriano en crecimiento. La flecha marca el tiempo en que se añade el desinfectante al cultivo. (Ref. 6)



La destrucción de los microorganismos y la inhibición de su crecimiento dependen de: (1,8,9,10,11,12,13)

- ❖ Factores biológicos: determinan la procedencia de establecer la sensibilidad o resistencia de los microorganismos frente a los cuales actúa el biocida.

*Tamaño de la población.* Como se destruye una fracción constante de población microbiana en cada intervalo, una población mayor necesitará más tiempo para morir que una más pequeña.

*Composición de la población:* La eficacia de un biocida varía considerablemente con la naturaleza de los microorganismos que se van a tratar porque estos difieren sustancialmente en cuanto a su susceptibilidad.

- ❖ Factores físicos: cuando uno de estos factores permanece constante, los otros tendrán que variar de forma inversamente proporcional para mantener una equivalencia de actividad para el producto.

*Concentración del agente:* En general, cuanto más concentrado esté el principio activo de un biocida, más rápidamente se destruyen los microorganismos. Sin embargo, la eficacia no está directamente relacionada con la concentración o intensidad; si esta se modifica se provocan cambios en el tiempo para lograrse un mismo efecto.

*Duración de la exposición:* el tiempo necesario para destruir los microorganismos aumenta en proporción directa con la cantidad de microorganismos (carga microbiana); cuanto más tiempo se exponga una población al biocida, más organismos se destruirán.

*Temperatura.* Normalmente, un agente químico aumenta su eficacia al aumentar la temperatura. Por ello, con frecuencia se puede reducir la concentración de un biocida si se utiliza a una temperatura superior.

- ❖ Factores físico-químicos: pH, es importante para cambiar la carga iónica en la superficie del microorganismo o bien para alterar el grado de acidez o alcalinidad



del medio en el que vive. El agua empleada en la dilución del biocida; si se trata de agua destilada no existe dificultad alguna; sin embargo, las sales de Calcio o de Magnesio presentes en el agua corriente pueden inactivar al biocida.

- ❖ Factores estructurales: la presencia de materia orgánica, dificulta el acceso del principio activo en los microorganismos por la naturaleza del material sobre el cual se encuentran. Por lo tanto, la tensión del solvente debe romperse con la adición de un detergente o humectante.

La actividad de agentes antimicrobianos se cuantifica a menudo como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento del organismo designado (CMI) o como una concentración que no deja ningún sobreviviente perceptible después de un tiempo de contacto específico (concentración mínima bactericida CMB, generalmente tomado como >99.9% muerte).<sup>(34)</sup> Sin embargo, aunque la CMI posibilita un punto de partida, en el campo de los biocidas sirve para evaluar la actividad antimicrobiana intrínseca de un producto en comparación con otros, confirmar desde el punto de vista epidemiológico la sensibilidad esperada de las especies microbianas y para vigilar y evaluar la resistencia de las bacterias a los antisépticos y desinfectantes.<sup>(3)</sup>



### 1.3.- MECANISMOS DE ACCION BIOCIDA

El considerable avance en el estudio sobre el mecanismo de acción de los antisépticos y desinfectantes (tabla 1), se ha realizado mediante la comprensión de los mecanismos de acción antibacteriana con ambas clases de biocidas. En contraste, estudios sobre su modo de acción contra hongos, virus y protozoarios no son claros y concisos; además, poco se conoce de la acción que estos agentes tienen frente a los priones. <sup>(14)</sup>

SITIO	BIOCIDA	MECANISMO DE ACCION
Envoltura celular (pared celular, membrana externa)	Glutaraldehído EDTA	Unión a proteínas  Bacterias gramnegativas: liberación de iones $Mg^{2+}$ en el lipopolisacárido
Membrana citoplasmática	QAC's  Clorhexidina  Diaminas  Biguanidinas poliméricas, alexidina  Fenoles	Daño generalizado que implica la bicapa de fosfolípidos  Bajas concentraciones afectan la integridad de la membrana; altas concentraciones causan coagulación del citoplasma  Inducción del escape de aminoácidos  Separación de la fase y dominio de la formación de lípidos de membrana  Escape; desacoplamiento
Unión con macromoléculas	Formaldehído  Glutaraldehído	Unión a proteínas, ADN y ARN  Unión a proteínas de la envoltura celular y otros sitios celulares
ADN	Acridinas  Halógenos  Peróxido de Hidrógeno, Iones de Plata	Intercalación de moléculas de acridina entre los pares de bases del ADN  Inhibición de la síntesis del ADN  Ruptura de la hebra del ADN
Interacción con grupos tiol (-SH)	Compuestos de Plata	Interacción con los grupos tiol en las enzimas de la membrana
Agentes oxidantes	Halógenos  Peróxidos	Oxidación de grupos tiol a disulfitos, sulfóxidos o disulfóxidos  Peróxido de Hidrógeno: actividad hacia formación de radicales libres ( $\cdot OH$ ), que oxidan grupos tiol en enzimas y proteínas Ácido Peracético: disrupción de grupos tiol en proteínas y enzimas

**Tabla 1.-** Sumario de mecanismos de la acción antibacteriana de antisépticos y desinfectantes<sup>14</sup>



Cualquiera que sea el tipo de células microbianas, es probable que exista una secuencia común de eventos (figura 5), la cual puede ser evidenciada como una interacción del antiséptico o desinfectante con la superficie de la membrana celular del microorganismo, seguida de la penetración dentro de la célula y luego su acción sobre un blanco, alterando las funciones normales del microorganismo. El sitio de absorción más importante es la membrana citoplásmica, cuya composición y naturaleza varían según el tipo de microorganismo; esto puede tener un efecto importante sobre la sensibilidad a los biocidas ya que puede alterarse como resultado de los cambios en el medio ambiente. <sup>(2,14)</sup>



**Figura 5.** Secuencia común de eventos que describe el mecanismo de acción de los biocidas<sup>16</sup>

El mecanismo de acción de los antisépticos y desinfectantes depende de tres factores básicos:

- 1.- Capacidad de coagular y precipitar proteínas.
- 2.- Alterar las características de permeabilidad celular.
- 3.- Toxicidad o neutralización de los sistemas enzimáticos del microorganismo.

Estos pueden producir la muerte o inhibición celular por oxidación, hidrólisis o inactivación de enzimas, con pérdida de los constituyentes celulares. <sup>(2,12)</sup>

**1.3.1.-ALCOHOLES:** muchos tienen actividad antimicrobiana apreciable. Exhiben rápidamente un amplio espectro de actividad antimicrobiana sobre bacterias vegetativas (incluyendo micobacterias), virus y hongos pero no son esporicidas. Se sabe que inhiben la esporulación y germinación de esporas, pero este efecto es reversible, debido a esto, no se recomiendan para la esterilización pero tienen uso extendido en la desinfección y antisepsia de la piel. <sup>(1,2,7,11,13,14,16)</sup>



Los más comúnmente utilizados por su solubilidad en agua son el etanol e isopropanol; el etanol tiene buena actividad virucida, mientras que el isopropanol es más eficaz contra las bacterias y destruye solo virus que contienen lípidos.

La actividad antimicrobiana de ambos alcoholes es significativamente débil a una concentración menor de 50%, pero es óptima en un rango de 60-90%. (1,2,7,11,13,14,16) En pequeñas concentraciones se han utilizado para preservar y potenciar la actividad de otros biocidas. (14)

Se conoce poco acerca del modo de acción específico de los alcoholes; su eficacia está basada en la solubilidad en el agua, ya que penetran mejor en las células bacterianas; alterando la membrana por una rápida desnaturalización de proteínas y quizás también de lípidos, ocasionando interferencia sobre el metabolismo y la consecuente lisis celular. (1,2,7,11,13,14,16)

**1.3.2.-ALDEHÍDOS:** El glutaraldehído es un dialdehído con alta toxicidad, actualmente es utilizado como desinfectante de alto nivel (en solución acuosa con pH ácido) o esterilizante químico (activado en solución con pH alcalino) de endoscopios e instrumentos utilizados en terapia respiratoria o anestésica particularmente a bajas temperaturas. Sin embargo, su actividad disminuye rápidamente. (14)

Tiene un amplio espectro de actividad contra las bacterias y sus esporas, hongos y virus. Tiene acción moderada sobre micobacterias; la captación de glutaraldehído es mayor durante la germinación que en las esporas maduras, pero menor que en las células vegetativas. (1,2,7,8,11,13,14,16)

Su mecanismo de acción depende del pH en la solución e incluye la disrupción de la membrana celular por medio de la unión a aminos superficiales no protonadas; esto se potencia a pH alcalino. Cuando el pH externo es alterado desde ácido hasta alcalino se formaran más sitios reactivos (grupos amino protonados) en la superficie celular, llevando a un efecto bactericida más rápido. (2,8,14)

La fuerte unión a las capas externas de los organismos conlleva a la precipitación y/o alteración química de proteínas (por su fuerte interacción con la lisina y otros aminoácidos) y ácidos nucleicos, y a la afectación secundaria en la



función enzimática intracelular por falta de captación de sustratos. Además, se ha demostrado su inhibición sobre el transporte en bacterias gramnegativas, de la actividad deshidrogenasa y de las enzimas en el espacio periplásmico; así como del RNA y DNA, además de la síntesis de proteínas. <sup>(1,2,7,8,11,13,14,16)</sup>

Normalmente se usa como una solución al 2% a pH alcalino (7.5-8.5) para lograr un efecto esporicida; las concentraciones bajas (<0.1%) previenen la fase de latencia en las esporas y su germinación. En contraste, las concentraciones superiores (0.1-1%) reducen significativamente la captación de L-alanina, posiblemente como resultado de un efecto de sellado en la superficie celular. <sup>(14)</sup>

No existe ningún estudio reciente sobre de los mecanismos de acción fungicida del glutaraldehído. El más antiguo sugiere que la pared celular del hongo es el principal sitio blanco, ya que el mayor componente de la pared, la quitina, es análogo al peptidoglicano presente en la pared celular bacteriana. <sup>(14)</sup>

Reduce la actividad del antígeno de superficie (HBsAg) y del antígeno de core (HBcAg) en el virus de la hepatitis B, y actúa recíprocamente con los residuos de lisina en la superficie del virus de la hepatitis A (HAV). A concentraciones bajas (<0.1%) de glutaraldehído a pH alcalino son eficaces contra el poliovirus purificado; mientras que su ARN es muy resistente a concentraciones por arriba del 1% a pH de 7.2; mientras que a una concentración de 0.05-0.005% interactúa con las proteínas de la capsida de poliovirus y echovirus, respectivamente, lo cual es un reflejo probable de grandes variaciones estructurales entre los dos virus. <sup>(14)</sup>

**1.3.3.-AGENTES LIBERADORES DE CLORO.** (CRAs por sus siglas en inglés) El cloro fue uno de los primeros antisépticos en usarse incluso, antes de conocerse su mecanismo de acción.<sup>(2)</sup> Los compuestos clorados más importantes son el hipoclorito de sodio, el dióxido del cloro, y los compuestos N-clorados como el dicloroisocianurato de sodio (NaDCC) y la cloramina-t. <sup>(14)</sup>

Las soluciones de cloro tienen un amplio espectro de actividad ya que son activos frente a bacterias, esporas, hongos, virus y protozoos; pero, su actividad es variable frente a micobacterias ya que ésta depende de la concentración utilizada. Se usan ampliamente para desinfección de las superficies y también para



desinfectar utensilios contaminados con sangre de portadores de HIV o HBV; sin embargo, su actividad disminuye en presencia de materia orgánica. <sup>(1,2,4,7,11,13,14,16)</sup>

En agua, el hipoclorito de sodio se ioniza para producir iones  $\text{Na}^+$  y el ion hipoclorito  $\text{OCl}^-$ , que establece un equilibrio con el ácido hipocloroso  $\text{HOCl}$ . A pH de 4.0-7.0, el cloro existe predominantemente como  $\text{HClO}$ ; y su especie activa,  $\text{OCl}^-$  predomina sobre un pH de 9.0. El ácido hipocloroso ha sido considerado la especie activa, aumentando la inactivación bacteriana a pH bajo, cuando el porcentaje de  $\text{HOCl}$  sin diluir es más alto. <sup>(2,14,16)</sup>

El mecanismo de acción real no se conoce totalmente; penetran fácilmente en la célula bacteriana a través de la membrana citoplasmática, donde son agentes oxidantes activos que inhiben las reacciones enzimáticas al desnaturalizar las proteínas (se combinan con los grupos  $-\text{SH}$  libres, amino, indol e hidroxifenol de la tirosina) y los ácidos nucleicos (formación de derivados clorados a partir de las bases nucleotídicas), por lo que destruyen la actividad celular. Al ácido hipocloroso se le ha asociado con la interrupción de la fosforilación oxidativa. <sup>(1,2,4,7,11,13,14,16)</sup>

En un estudio, McKenna y Davies describieron la inhibición del crecimiento bacteriano por el ácido hipocloroso: A 50  $\mu\text{M}$  (2.6 ppm), inhibió completamente el crecimiento de *Escherichia coli* dentro de 5 min, y la síntesis de ADN se inhibió en un 96%; sin embargo, la síntesis proteica se inhibió sólo en 10 a 30%. Esto, debido a que las concentraciones por debajo de 5 mM (260 ppm) no inducen ruptura de la membrana bacteriana o degradación proteica extensa; por lo tanto, se determinó que la síntesis de ADN era el blanco sensible. A concentraciones superiores son esporádicas, esto depende del pH y concentración de cloro disponible. <sup>(14)</sup>

Su actividad virucida ha sido destacada. Olivieri et al., mostraron que el cloro inactiva el ARN desnudo en la misma proporción que al ARN intacto del fago  $\text{f}_2$ . Taylor y Butler encontraron que el ARN del poliovirus tipo 1 era degradado en fragmentos por el cloro; pero, su inactivación precedió a cualquier cambio morfológico severo. En contraste, Floyd et al., O'Brien y Newman demostraron que bajo estas condiciones la cápside del poliovirus tipo 1 se rompe. <sup>(14)</sup>



**1.3.4.-YODO Y LOS YODOFOROS.** Aunque menos reactivo que el cloro, las soluciones de yodo a base de agua o alcohol (tintura) han sido utilizadas durante 150 años como antiséptico, estas se han asociado con irritación y manchado excesivo.<sup>(2)</sup> Estas soluciones son generalmente inestables; ya que contienen presentes por lo menos, siete especies de yodo en un equilibrio complejo, siendo el yodo molecular ( $I_2$ ) el principal responsable de la acción antimicrobiana.<sup>(14)</sup>

Los efectos nocivos se superaron con el desarrollo de los yodóforos ("portadores de yodo" o agentes "liberadores de yodo"); los más ampliamente utilizados como antisépticos y desinfectantes son la yodopovidona y el yodopoloxámero. Aunque mantienen la actividad germicida del yodo, son considerados menos activos contra ciertos hongos y esporas que las tinturas.<sup>(2,14)</sup>

La acción antimicrobiana del yodo es rápida, a bajas concentraciones y posee amplio espectro que incluye bacterias, micobacterias, esporas, hongos, virus y quistes y protozoos. Sin embargo, se desconoce el modo de acción exacto; penetra rápidamente en los microorganismos y atacan los grupos importantes de proteínas (en particular, los residuos de tirosina y los grupos -SH libres en aminoácidos como cisteína y metionina) y nucleótidos; alteran las membranas celulares al unirse a los enlaces C=C de los ácidos grasos. Actúan disminuyendo los requerimientos de oxígeno en microorganismos aerobios, interfiriendo con la cadena respiratoria por bloqueo del transporte de electrones.<sup>(1,2,7,11,13,14,16)</sup>

La acción antiviral del yodo es poco conocida; sin embargo, los virus no lipídicos y los parvovirus son menos sensibles que los virus con envoltura lipídica. De forma similar a las bacterias, es probable que el yodo ataque las proteínas de la superficie de los virus envueltos, pero ellos también pueden desestabilizar los ácidos grasos de la membrana saturándolos con enlaces de carbono.<sup>(14)</sup>

**1.3.5.-COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO:** (QACs por sus siglas en inglés); los agentes activos en superficie (o surfactantes) poseen dos regiones bien diferenciadas en su estructura química: una región hidrocarbonada hidrofóbica y una región hidrofílica o polar, que puede darle o no carácter iónico al compuesto; de acuerdo con la presencia o ausencia de ionización en el grupo hidrófilo, estos son



clasificados en: catiónicos, aniónicos, y anfóliticos (anfóteros); de los cuales, los agentes catiónicos, representados por los compuestos de amonio cuaternarios (QACs), son los más utilizados como antisépticos y desinfectantes (denominados a veces como detergentes catiónicos). <sup>(2,14,16)</sup>

Son usados para una variedad de propósitos clínicos (como la desinfección preoperatoria de piel); además de tener propiedades antimicrobianas, también son útiles para la limpieza y desodorización de superficies duras, utensilios de alimentación y pequeños instrumentos. Los más comunes son el cloruro de benzalconio, el cloruro de cetilpiridinio, metilbenzetonio y la cetrimida. <sup>(2,14,16)</sup>

Considerados como desinfectantes de bajo nivel, son activos frente a bacterias (tanto grampositivas y gramnegativas en menor grado), hongos y virus encapsulados (lipofílicos pero no hidrofílicos). Aunque in vitro han reportado buena actividad, en condiciones habituales de uso su actividad es sumamente limitada, ya que presentan una rápida inactivación en presencia de jabón, agua dura, material orgánico, algodón, proteínas y gram-negativos (en numerosos brotes reportados se han relacionado como la principal causa de contaminación de estos agentes). <sup>(1,2,7,9,11,13,14,16)</sup>

El mecanismo de acción implica a las membranas biológicas como blanco primario (la membrana interna en bacterias o la membrana del plasma en la levadura). Salton propone la siguiente sucesión de eventos: **(1)** adsorción y penetración del agente en la pared de la célula; **(2)** reacción con la membrana citoplasmática (unión irreversible con los fosfolípidos o proteínas) seguido por la desorganización de la membrana; **(3)** salida del material intracelular de bajo peso molecular por la pérdida en la permeabilidad selectiva, **(4)** degradación de proteínas y ácidos nucleicos, y **(5)** lisis de la pared causado por las enzimas autolíticas. Hay una pérdida en la organización estructural e integridad de la membrana citoplasmática junto con otros efectos perjudiciales a la célula bacteriana. <sup>(2,14,16)</sup>

El efecto tóxico inicial de los QACs en las levaduras es una desorganización de las membranas del plasma, con ruptura de las estructuras de lípidos organizadas en las membranas (y en la bicapa de lípidos). <sup>(14)</sup>



Inhiben el desarrollo de una célula vegetativa a partir de la espora germinada, pero no el proceso de germinación en la espora (paso de la inactividad a un estado metabólicamente activo), aunque por un mecanismo desconocido. Igualmente, tienen una acción micobacteriostática, aunque los efectos reales en micobacterias han sido poco estudiados. <sup>(14)</sup>

Tienen un efecto sobre virus con envoltura lipídica (incluso VIH y VHB) pero no en virus no envueltos. Los productos con base QAC indujeron la desintegración y cambios morfológicos en el VHB humano, produciendo pérdida en la infectividad. En estudios con diferentes fagos, el CPC inhibió significativamente la transducción por el bacteriófago F116 e inactivó sus partículas. Además, alteró las bandas de sus proteínas pero no afectó ADN dentro de la cápside. <sup>(14)</sup>

**1.3.6.-PERÓXIDO DE HIDRÓGENO:** El agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) es un biocida ampliamente usado para la desinfección, esterilización, y antisepsia. Es un líquido claro, incoloro que está disponible comercialmente en una variedad de concentraciones que van de 3 a 90%. Está considerado como inocuo para el medio ambiente, debido a que puede degradarse rápidamente a los productos inocuos de agua y oxígeno. Aunque las soluciones puras son generalmente estables, la mayoría contiene estabilizadores para prevenir su descomposición. <sup>(14)</sup>

Demuestra un amplio espectro, eficaz contra virus, bacterias vegetativas (mayor contra grampositivas que gramnegativas), levaduras, y esporas bacterianas. La presencia de catalasa u otras peroxidasas en estos organismos puede aumentar la tolerancia en presencia de bajas concentraciones. <sup>(2,11,13,14,16)</sup>

Se requiere de altas concentraciones de  $H_2O_2$  (10 a 30%) y tiempos de contacto más largos para lograr una actividad esporicida, aunque esta actividad puede aumentar significativamente en fase gaseosa. <sup>(14)</sup>

Actúa como un oxidante produciendo radicales hidroxilo libres ( $\cdot OH$ ) que atacan a los componentes celulares esenciales, incluso lípidos, proteínas (enzimas) y ácidos nucleicos. Se ha propuesto que los grupos sulfhidrilo unidos por enlaces dobles son particularmente el blanco de ataque. <sup>(2,11,13,14,16)</sup>



**1.3.7.-AGUA SUPEROXIDADA:** producto obtenido al pasar una solución salina a través de electrodos de titanio con una corriente de 9 amperios; esto genera ácido hipocloroso (~144 mg/l) y cloro en forma de sus radicales libres. El producto listo para su uso tiene un gran potencial redox y pH de 5.0-6.5. <sup>(16)</sup>

Se propone que la acción antimicrobiana depende de la presencia de una mezcla de diversas especies oxidantes. Posee un amplio espectro antimicrobiano que incluye micobacterias, bacterias y sus esporas, virus, hongos. Baja capacidad de daño tisular; sin embargo, presenta una gran inestabilidad pues su actividad reduce rápidamente al contacto con material orgánico. <sup>(16)</sup>



## 1.4.- MECANISMOS DE RESISTENCIA

Las bacterias y otros microorganismos poseen mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales. Aunque la resistencia a los antimicrobianos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. En los últimos veinte años se ha hecho notorio que el incremento en el uso de los biocidas (antisépticos y desinfectantes) en la práctica general y en escenas domésticas e industriales, y la respectiva presión selectiva que estos ejercen, puede ser un factor importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana. <sup>(23,34)</sup>

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un nivel elevado y resistir los efectos de un agente antimicrobiano al que era sensible habitualmente; generalmente describe la insusceptibilidad relativa a un conjunto particular de condiciones. <sup>(11,34)</sup> Para el microorganismo esto tiene un valor de supervivencia y su expresión en situaciones médicas requiere la conservación de la virulencia a pesar del cambio de resistencia; las bacterias resistentes pueden tener más oportunidades para producir una enfermedad pero ésta es idéntica a la originada por la contraparte susceptible al antimicrobiano. <sup>(11,72)</sup>

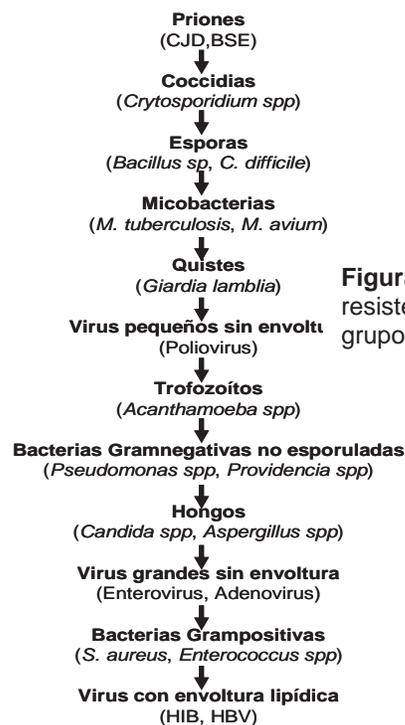
Para cualquier agente antimicrobiano, hay especies bacterianas típicas de su espectro y otras que no lo son; la resistencia de este último grupo se conoce como intrínseca o cromosómica por reflejar la naturaleza de su fisiología o bioquímica, en virtud de la ausencia de sitios blanco críticos o una incapacidad del agente para acumularse en esos blancos. Otros grupos pueden sufrir: cambios en la susceptibilidad que reflejan cualquiera de las condiciones bajo las cuales son cultivados o expuestos (cambio fenotípico); la expresión temporal de bombas de expulsión o síntesis de enzimas protectoras (cambio inducido); o mutaciones en los genes codificadores o reguladores de un sitio blanco sensible (cambio cromosómico). <sup>(3,11,14,34)</sup>

La adquisición o generación de elementos genéticos extrínsecos que codifican la resistencia (cambio mediado por plásmidos) puede ser responsable para



el rápido desarrollo y difusión horizontal de resistencia dentro de grupos de poblaciones, particularmente esto trae consigo la expresión de bombas de expulsión y las enzimas inactivadoras de drogas. Se piensa que el fenotipo, la mutación cromosómica-genotípica, y los mecanismos de inducción aumentan la resistencia y tiene relevancia más práctica en la susceptibilidad de biocidas que los cambios mediados por plásmidos. (14,22,34)

La resistencia bacteriana a los biocidas fue descrita en las décadas de 1950 y 1960 y se considera que ha ido en aumento. En años recientes, el considerable progreso se ha hecho estudiando de forma más completa las respuestas de los diferentes tipos de microorganismos a los agentes antimicrobianos ya que estos varían en su respuesta (figura 6). (7,10,14)



**Figura 6.-** Diagrama que muestra la resistencia a biocidas con relación al grupo de microorganismos. (Ref. 14)

#### 1.4.1.-Mecanismos de resistencia bacterianos intrínsecos

La susceptibilidad intrínseca a un biocida, documentada por la determinación de una CMI o de una CMB por los métodos estándares, no es un valor fijo. Más bien, el fenotipo de susceptibilidad expresado por la célula puede variar significativamente



según el ambiente fisicoquímico prevaleciente. La resistencia intrínseca está demostrada en las bacterias gram-negativas, esporas bacterianas, micobacterias, y, bajo ciertas condiciones, estafilococos. <sup>(14,34)</sup>

**l) Pared celular:** Para que una molécula de antiséptico o desinfectante alcance el sitio blanco, debe cruzar las capas externas de una célula. La naturaleza y composición de estas capas dependen del tipo de organismo y pueden actuar como una barrera de permeabilidad en la cual puede haber una captación reducida. <sup>(11)</sup> La tasa de crecimiento y cualquier nutriente limitante afectarán el estado fisiológico de las células. Bajo tales circunstancias, el espesor y grado de entrecruzamiento del peptidoglicano probablemente será modificado, alterando la sensibilidad celular a los antisépticos y desinfectantes. <sup>(14,28)</sup>

La pared celular de *Staphylococcus sp* está esencialmente compuesta de peptidoglicano y ácidos teicoicos. Ninguno de éstos parece actuar como una barrera eficaz a la entrada de algunos biocidas, esto puede explicar la sensibilidad de estos organismos a muchos agentes antibacterianos incluso QACs y clorhexidina. <sup>(14)</sup>

La resistencia de los estafilococos a los desinfectantes catiónicos se ha observado desde 1990. <sup>(28)</sup> En la naturaleza, *Staphylococcus sp* pueden existir como cepas mucoides, si las células están rodeadas por una capa de limo (slime), y cepas no mucoides; éstas últimas mueren más rápidamente que las cepas mucoides por el cloroxilenol, cetrimida y clorhexidina. Por consiguiente, el limo juega un papel de protección, como barrera física a la penetración del biocida o como una capa libre que actúe recíprocamente absorbiendo las moléculas del mismo. <sup>(3,14)</sup>

La membrana externa de las bacterias gram-negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos químicamente no relacionados. Las moléculas hidrófilas de bajo peso molecular pasan rápidamente vía porinas al interior de las células gram-negativas, pero las moléculas hidrófobas difunden del otro lado de la membrana externa. En bacterias de tipo salvaje las moléculas de lipopolisacárido (LPS) intactas, previenen el rápido acceso de moléculas hidrófobas hacia los fosfolípidos y de ahí al interior celular. <sup>(11,14)</sup>



La membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* es la responsable de su elevada resistencia, en comparación con otros organismos hay diferencias en la composición del LPS y en el contenido de cationes de la membrana exterior. El alto contenido de  $Mg^{2+}$  ayuda produciendo uniones fuertes entre dos moléculas de lipopolisacárido (LPS-LPS); además, debido a su tamaño pequeño, las porinas no pueden permitir la difusión general a través de ellos. En contraste, *Pseudomonas stutzeri* es muy sensible a muchos antibióticos y desinfectantes, lo cual implica que tales agentes tienen menor dificultad cruzando las capas exteriores de las células de este organismo. <sup>(14)</sup>

Al igual que en *Proteus sp*, algunas cepas de *Providencia stuartii* aisladas de infecciones del tracto urinario en pacientes parapléjicos fueron resistentes a diferentes tipos de biocidas incluyendo clorhexidina y QACs. Las cepas que mostraron resistencia de bajo-, intermedio- y alto-nivel a clorhexidina formaron la base de una serie de estudios de los mecanismos de resistencia en los cuales no se detectaron grandes diferencias en la composición de las capas exteriores de estas cepas, concluyéndose entonces que (I) los cambios sutiles en el arreglo estructural de las envolturas celulares estaban asociados con la resistencia y (II) la membrana interna no estuvo implicada. <sup>(14)</sup>

La membrana interna o citoplásmica está compuesta por lipoproteínas que impiden el paso por difusión pasiva de las moléculas hidrofílicas; sin embargo, aunque esta implicada en la resistencia al etanol (por cambios en su composición), actualmente hay poca evidencia que la implique en la resistencia a biocidas. <sup>(3)</sup>

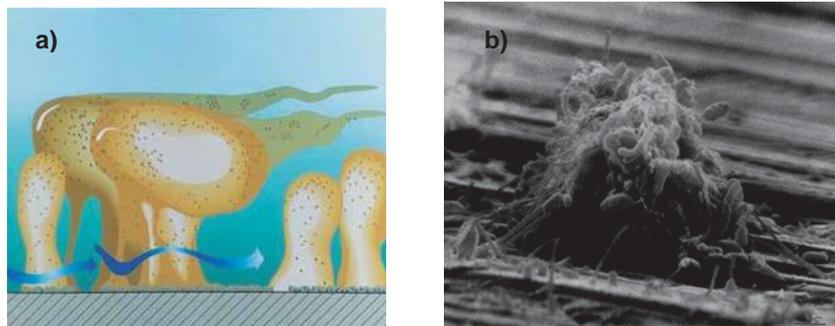
**II) Biofilm:** se forma cuando la bacteria detecta ciertos parámetros ambientales: disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios en la osmolaridad, pH, la tensión de oxígeno y la temperatura, que disparan la transición de la forma planctónica a un crecimiento sobre una superficie. <sup>(48)</sup>

Es una comunidad derivada de microbios sésiles caracterizada por células que están irreversiblemente adheridas a un sustrato o interfase o cada una a otra, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas producen, y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y



transcripción génica en comparación con las células planctónicas encontradas en los cultivos de laboratorio. <sup>(40,46)</sup>

Estructuralmente se compone de la masa de células que puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbianas, los espacios intercelulares o canales y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacárido, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias (figura 7). <sup>(48)</sup>



**Figura 7.-** a) Representación esquemática de la estructura tridimensional de un biofilm sobre una superficie. b) Microfotografía de un biofilm desarrollándose sobre una superficie metálica. (Ref. 46)

La naturaleza de la estructura del biofilm y atributos fisiológicos de los organismos dentro de él, le confieren una resistencia inherente a agentes antimicrobianos. Algunos de los factores que se han considerado responsables de esta resistencia son:

a) Penetración restringida. Al estar inmersos dentro de una matriz de exopolisacárido cargado negativamente los biofilms pueden restringir la difusión de sustancias y la unión de antimicrobianos probablemente a través de la interacción química entre el agente antimicrobiano y el biofilm, o la producción de enzimas degradativas y neutralizadores de químicos. <sup>(40,48)</sup>

Las células biofilm-asociadas son más resistentes a muchas sustancias tóxicas como los antibióticos, biocidas, detergentes y moléculas grandes como proteínas antimicrobianas del complemento y la lisozima. La barrera de difusión es probablemente eficaz también contra péptidos antimicrobianos menores como las defensinas y sus análogos. <sup>(39,46)</sup>



Un caso interesante de esta barrera se describió para el agua oxigenada. Las células planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* que eran muy sensibles se morían con 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que las células del biofilm, que realmente tenían más bajo nivel de catalasa (KatA), eran eficazmente protegidas. La penetración restringida de esta pequeña molécula acoplada a su destrucción por las células microbianas eran aparentemente responsables de esta resistencia. <sup>(40)</sup>

b) Tasa de progresión disminuida. Virtualmente todos los antimicrobianos son más eficaces matando rápidamente células en crecimiento; por lo tanto, el crecimiento lento contribuye indudablemente en la resistencia a la muerte del biofilm. De forma similar, es un factor importante en el aumento de la resistencia a la muerte en células planctónicas estacionarias. <sup>(40)</sup>

En general se ha asumido que la resistencia del biofilm puede ser un rasgo compartido por todas las células que lo constituyen o por lo menos estar presente regularmente en la población. Como las células en las capas más profundas del biofilm tienen menos acceso a los nutrientes, estas crecerán más despacio; por lo tanto, adquieren un estado semilante (persistente) sobreviviendo en presencia del antimicrobiano que inhibe su crecimiento (no sólo evaden el ataque de antibióticos, también resisten a desinfectantes químicos como hipoclorito y glutaraldehído). Paradójicamente, el agente antimicrobiano ayuda a la persistencia. <sup>(40,47,48)</sup>

Las bacterias persistentes que representan menos del 1% de la colonia, no son resistentes en el sentido estricto del término, sino que son tolerantes porque no presentan alteraciones o mutaciones que impiden la unión del antimicrobiano a su sitio blanco. Estudios in vitro han permitido clarificar que la persistencia bacteriana no se genera por mutación espontánea sino como un factor que se hereda y se afecta por la expresión de ciertos genes como hip identificados en *Escherichia coli*. <sup>(48,49)</sup>

c) Expresión de posibles genes de resistencia biofilm específicos. Existe evidencia de que los genes del ciclo de vida bacteriano se transcriben de manera diferente en células planctónicas y las asociadas a biofilm. Así mismo, las bacterias en respuesta y acoplamiento a fluctuaciones ambientales como cambios de temperatura,



oxidación, baja disponibilidad de oxígeno y daños al DNA expresan genes, los cuales se transfieren entre ellas por donación mediante conjugación logrando un mecanismo de supervivencia específico que explica su notable resistencia a un gran número de agentes. <sup>(3,14,39,40,46,47,48,49)</sup>

Prigent-Combaret et al., encontraron que la síntesis del flagelo disminuye en las células biofilm-asociadas, mientras que la producción de ácido colánico, un exopolisacárido hecho por *Escherichia coli* aumenta. Una situación similar ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, la cual produce el exopolisacárido alginato cuando se encuentra en biofilms; la transcripción del gen algC, está involucrada en la producción del alginato y aumenta aproximadamente cuatro veces en las células biofilm-asociadas comparado con células planctónicas. <sup>(39)</sup>

Se especula, que el biofilm posiblemente actué como un nicho para la generación de organismos resistentes dada la capacidad de ciertas bacterias para intercambiar material genético por conjugación y contribuir así a la transmisión de posibles factores de resistencia o de virulencia así como la capacidad de supervivencia en el medio ambiente. <sup>(39,47)</sup>

Investigaciones de laboratorio han mostrado que la resistencia de bacterias a muchos antibióticos y biocidas durante la fase estacionaria de crecimiento o en el biofilm es típicamente órdenes de magnitud mayor que las células en fase logarítmica. En condiciones simuladas de uso con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mostraron que, mientras la concentración bactericida de cloruro del benzalconio para producir una reducción de 5-log en 5 min contra las suspensiones crecidas en laboratorio era 10-20 mg/l, la concentración requerida para producir un efecto similar contra simples biofilms crecidos en 24 h sobre los discos de acero limpios era tanta como 2,000 mg/l. <sup>(34)</sup>

Stickler et al., mostraron que los biofilms mixtos de *Citrobacter diversus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y monocultivos en biofilm de *Escherichia coli* crecidos en discos de silicón no mostraron ninguna pérdida significativa de viabilidad cuando fueron tratados con 0.2% clorhexidina y yodo povidona (1% peso/vol de yodo disponible) después de 120 min. <sup>(34)</sup>



**III) Bombas de expulsión:** Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los agentes tóxicos. Entre ellos se encuentran principalmente transportadores en la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. Estas bombas de expulsión, a veces con una amplia especificidad (principalmente hacia moléculas lipofílicas o anfipáticas), contribuyen a la resistencia intrínseca de algunas bacterias a una variedad de agentes. <sup>(34,53,70)</sup>

Estudios del genoma han revelado que las bombas de expulsión están ampliamente distribuidas en la naturaleza, en todos los tipos de células, tanto procariotas como eucariotas (pudiendo contribuir en este caso a la resistencia a agentes antitumorales). Cualquiera de los tipos podría estar involucrado principalmente en la expulsión de metabolitos endógenos o en la expulsión de agentes quimioterapéuticos principalmente. De hecho, es probable que estos transportadores evolucionaran originalmente para expulsar los metabolitos endógenos, pero esta habilidad de excluir las sustancias dañinas coincidentemente ha demostrado ser una estrategia de supervivencia deseable que ha sido seleccionada e incorporada, por la mayoría de géneros conocidos y especies de bacteria. <sup>(34,52,72)</sup>

Son funcionales en una amplia variedad de organismos gram-negativos, están muy conservadas y son codificadas cromosómicamente, aunque también pueden transferirse por plásmidos (genes tet y qac). Su expresión es inducida a través de la exposición a una concentración sub-letal de una gran variedad de agentes que no solo incluye a los antibióticos hidrófilos pequeños sino también a otros como colorantes, detergentes y xenobióticos como los compuestos de amonio cuaternario, aceite de pino y salicilato. <sup>(34,52,53,54,55,72)</sup>

Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar un amplio rango de compuestos estructuralmente diferentes; por lo tanto, pueden asociarse con resistencia a múltiples drogas (multidrug resistance MDR), cuando expulsan antimicrobianos de por lo menos tres clases diferentes: antibióticos, desinfectantes (biocidas), tinturas y detergentes. <sup>(52,65,70)</sup>



Poole enlista los detalles disponibles para las bombas de expulsión bacterianas específicas: 1) las CMI de los antimicrobianos sustratos para cepas que sobreexpresan la bomba de expulsión son típicamente dos a ocho veces superiores que aquéllas cepas de la especie típicamente susceptibles; 2) en los mutantes que tienen reprimido o anulado un gen de la bomba, las CMI de los sustratos de esa bomba disminuyen, dando una cepa hipersusceptible. <sup>(52)</sup>

En la mayoría de los casos, los aumentos en las CMI debido a la sobreexpresión de una bomba MDR no confiere la misma magnitud como otros mecanismos de resistencia. <sup>(54,55)</sup>

Los sistemas de bombas de expulsión se agrupan en cinco familias (figura 8) sobre bases bioenergéticas y criterios estructurales<sup>(52,53,60)</sup>; mientras que a su vez los sistemas MDR se dividen en dos clases: una clase de transportadores utiliza el potencial electroquímico transmembranal del protón o del ion sodio, mientras que la otra clase utiliza la energía libre de la hidrólisis del ATP para dirigir la expulsión de drogas de las células<sup>(70)</sup>.

- ❖ Familia nodulación de la resistencia de células en división (resistance nodulation cell division RND). A su vez puede subdividirse filogenéticamente en tres grupos: uno contiene proteínas responsables de la expulsión de metales pesados (CzcA y CnrA), el segundo está involucrado en la secreción de factores moduladores (NolFGH) y el tercero representado por las bombas de expulsión multidrogas en bacterias gram-negativas (Acr, Mex y Mtr).
- ❖ Superfamilia del facilitador mayor (MSF).
- ❖ Familia de resistencia a multidrogas en Staphylococcus (SMR).
- ❖ Familia expulsión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE)
- ❖ Los transportadores ABC (cassette transportadores de ATP-en superficie) todavía no han sido establecidos en la resistencia bacteriana a múltiples drogas.

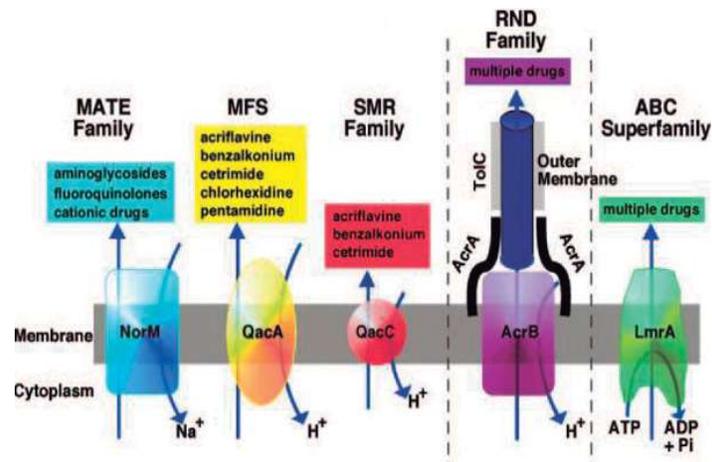
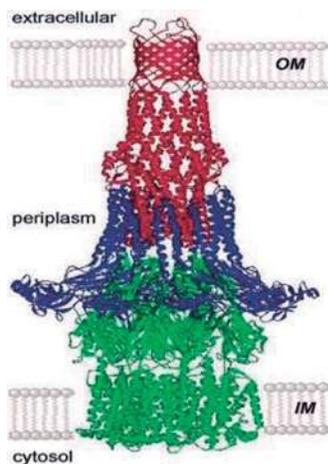


Figura 8.- Representación esquemática de la organización y funcionamiento de las cinco familias de bombas de expulsión. (Ref. 52)

Los sistemas de bombas de expulsión de la familia RND están organizados en tres partes (figura 9). En *Escherichia coli* (AcrA-AcrB-TolC) y otros bacilos gram-negativos tienen tres componentes: un transportador (expulsor), una proteína en la membrana interna (AcrB) compuesta por 12 segmentos transmembrana, es antipuerto de la expulsión de  $\text{H}^+$ ; una proteína periplásmica adicional (AcrA) que une o fusiona a las membranas interna y externa y una proteína canal en la membrana exterior (TolC), o cualquier proteína terminal (OMP) u otro factor de la membrana exterior. Estas tres proteínas forman un canal que permite la expulsión de las moléculas sustrato directamente desde el citoplasma o periplasma hacia el medio externo, AcrB captura los sustratos dentro de la bicapa de fosfolípidos de la membrana interna de la envoltura celular o el citoplasma y los transporta al exterior por TolC. La cooperación entre AcrB y TolC se media por la proteína periplásmica AcrA. El enorme complejo proteico se encuentra en la membrana y funciona como una eficiente bomba de expulsión que transporta los iones tóxicos desde el citoplasma hasta el exterior de la célula bacteriana. (52,53,59,60)



**Figura 9.-** Modelo de la estructura de la bomba RND MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa*. Verde proteína expulsora (MexB); rojo la proteína canal (OprM) y azul proteína puente o periplásmica (MexA). (Ref. 52)

#### 1.4.2.-Mecanismos de resistencia bacterianos adquiridos.

Los mecanismos de resistencia bacteriana adquirida pueden ser consecuencia de mutaciones o de la adquisición de material genético externo, ya sea mediante plásmidos o transposones. A diferencia de los antibióticos un incremento en la CMI frente a un biocida, no se correlaciona necesariamente con un fallo terapéutico. Es necesario evaluar en la resistencia a biocidas, no solo el incremento en la CMI como consecuencia de algún mecanismo adquirido, sino que también tomar en cuenta el efecto pleiotrópico, la actividad microbicida, concentración de uso, aplicación directa y efectos de la formulación de la mayoría de los biocidas.<sup>(3,14)</sup>

**1) Plásmidos:** Es sabido desde mediados de los años sesenta, que son el mejor vector de diseminación horizontal de factores de resistencia y determinantes de virulencia. Mientras que tales elementos genéticos pueden fusionarse para producir plásmidos de gran multirresistencia, las fusiones son inherentemente inestables. La persistencia de plásmidos con resistencia múltiple por consiguiente, refleja la presión selectiva combinada a que las células que los contienen son expuestas.<sup>(11,73)</sup>

El transporte de rasgos de resistencia a biocidas ha sido asociado con la adquisición de plásmidos en organismos de tipo silvestre, pero la magnitud del cambio asociado, en todos los casos, ha sido insuficiente para conferir la resistencia



a las concentraciones de uso de estos agentes. Por consiguiente, el cambio de susceptibilidad esta más probablemente relacionado a los efectos indirectos del plásmido, como los cambios en la envoltura celular. <sup>(34)</sup>

La primera evidencia de que los plásmidos podrían ser capaces de codificar la reducción en la susceptibilidad a agente biocidas así como a los antibióticos estuvo relacionada específicamente a los metales pesados (plata, mercurio, organomercuriales) y la resistencia al cobre. En años recientes, se ha observado resistencia adquirida a otros ciertos tipos de biocidas, notablemente en estafilococos. <sup>(14)</sup>

Significativamente numerosas publicaciones, han evaluado la CMI de varios biocidas e intentaron relacionar éstos a la presencia de plásmidos de resistencia antibiótica. Así los plásmidos que transportan la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* han alterado la susceptibilidad a una variedad de biocidas que incluyen clorhexidina, cetrimida, cloruro de benzalconio, hipoclorito, triclosán, parahidroxibenzoatos y betadina. Estudios más recientes han asociado la presencia de plásmidos en bacterias con resistencia de bajo nivel a clorhexidina, compuestos de amonio cuaternario, triclosán, y hexaclorofeno. Sin embargo en ninguno de estos casos se ha demostrado que tienen una conexión causal, aunque es probable que en esos estudios que involucran los compuestos basados en amonio cuaternarios, la expulsión pudiera implicarse. <sup>(14,34)</sup>

Los estafilococos son las únicas bacterias en las cuales los aspectos genéticos de los mecanismos de resistencia a antisépticos y desinfectantes mediada por plásmido se han descrito. En *Staphylococcus aureus* y los estafilococos coagulasa-negativa (CoNS) estos mecanismos están codificados por al menos tres determinantes de resistencia a múltiples drogas (ver figura 8), las familias de determinantes genéticas (qacA, qacB y smr o qacCD). qacA predomina en la familia de plásmidos de multirresistencia psK1, pero también se encuentra en el cromosoma de cepas de origen clínico como plásmido integrado. Mientras que el gen qacB se ha detectado en plásmidos de B-lactamasas y de resistencia a metales pesados como pSK23; los genes qacC y qacD codifican fenotipos idénticos y se encuentran típicamente en los plásmidos pSK89 y pSK41; el gen qacC pudo haber evolucionado



del *qacD*. Los genes *qacA* y *qacB* codifican proteínas que son miembros de la superfamilia de proteínas expulsoras del facilitador mayor (MSF) que desarrollan homología significativa a otros transportadores energía-dependientes como los de tetraciclina. Otros dos genes adicionales *qacG* y *qacH* aislados de CoNS en la industria alimenticia, son transportados por plásmidos y por lo general están normalmente albergados por plásmidos pequeños menos de 3kb; junto a *qacC* codifican proteínas expulsoras pertenecientes a la familia SMR (small multidrug resistance). Son mediadores de la resistencia a varias clases de cationes orgánicos como colorantes, compuestos de amonio cuaternario, diamidinas y biguanidinas; entre otros antimicrobianos hidrofóbicos. <sup>(3,14,34,36,37,56)</sup>

Existe evidencia de que el traslado de plásmidos recombinantes entre el donador y las células del destinatario están significativamente reducidas en presencia de biocidas como los agentes catiónicos y organomercuriales. Así, Pearce et al., informaron que concentraciones sub-inibitorias mínimas de clorhexidina, yodo povidona y ceftrimida pudieron reducir la transferencia conjugativa y transductiva de determinantes de resistencia. Igualmente, Christensen et al., encontraron que la transferencia conjugativa del plásmido TOL pWWO disminuyó en presencia de fenol dentro de una comunidad de biofilm de tres-especies. Lakshmi et al., demostraron que algunos fenoles existentes naturalmente podrían curar a *E. coli* de algunos marcadores de resistencia ligados a plásmido. <sup>(34,37)</sup>

La evidencia de resistencia a las moléculas biocidas llevada por plásmidos en las especies gram-negativas es relativamente limitada. Tales cambios codificados por plásmidos aparentemente están relacionados con cambios particularmente en las proteínas de la membrana y han sido asociados con la disminución en la susceptibilidad al formaldehído. De forma similar, la presencia de algunos plásmidos en *Escherichia coli* ha mostrado que alteran la composición del lipopolisacárido de la membrana externa y reducen el nivel de expresión de las proteínas porina. Tales cambios Podrían asociarse con la susceptibilidad disminuida al ceftrimida, clorhexidina y fenol. <sup>(3,14,34,35)</sup>



**II) Mutación:** La resistencia adquirida puede ocurrir cuando se produce una mutación crucial en el blanco del antimicrobiano o en las proteínas relacionadas con el acceso al blanco (permeabilidad); cuando ocurren en proteínas reguladoras también pueden ocasionar resistencia. La frecuencia de las mutaciones es baja y sólo se expresan si no se relacionan con otros efectos desventajosos para la célula bacteriana; pueden surgir en un solo paso o evolucionar por muchas mutaciones antes de alcanzar importancia clínica. <sup>(11)</sup>

La resistencia adquirida a biocidas, no codificada por plásmidos, puede ser el resultado de la exposición de la misma al agente químico. Ejemplos de esto lo son *Serratia marcescens* y la resistencia a QACs; *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* a clorhexidina; no obstante, este tipo de resistencia adaptativa no genética es un fenómeno temporal. Se ha confirmado el desarrollo de resistencia estable en *Pseudomonas stutzeri* a clorhexidina y QACs tras la exposición gradual a concentraciones cada vez mayores; las cepas resistentes a clorhexidina lo fueron también a triclosán y a algunos antibióticos, pero esta resistencia no fue transferible indicando que el mecanismo de tal resistencia era inespecífico y que estaba relacionado con alteraciones en la membrana externa. <sup>(3,14)</sup>

Cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* tratados para generar resistencia frente a concentraciones crecientes de polimixina mostraron una disminución en la susceptibilidad a los compuestos del amonio cuaternarios. Guerin-Mechin et al., notaron cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana interna y externa en células tratadas con compuestos de amonio cuaternario que sería consistente con los cambios en el lipopolisacárido o en la hidrofobicidad de la membrana. En forma similar, Ismaeel et al., observaron disminución en la susceptibilidad de *Providencia stuartii* a clorhexidina que también podría atribuirse a los cambios en la membrana exterior. Nicoletti et al., notaron que los cambios en la susceptibilidad inducida por el pase de *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* durante 12 semanas generó alteraciones coexistentes en la susceptibilidad a las formulas basadas en amonio cuaternario. <sup>(3,14,34)</sup>

Las mutaciones, incluso en una sola base nucleotídica en el ADN de la bacteria pueden sobreexpresar las bombas de expulsión implicadas en la MDR.



Cuando esto ocurre, el sistema de expulsión permite a las células bacterianas elevar el nivel de resistencia a los agentes que son sustrato del mismo. La resistencia por expulsión a los antimicrobianos en un aislamiento mutante se debe uno de estos dos mecanismos: (I) la expresión de la proteína de la bomba de expulsión se aumenta o (II) la proteína contiene una(s) sustitución(es) del aminoácido que la hace más eficaz a la exportación. En cualquier caso, la concentración intracelular del sustrato antimicrobiano baja y el organismo parece menos susceptible a ese agente, permitiendo así la supervivencia bacteriana por un lapso mayor de tiempo. <sup>(52)</sup>

Existe un número de agentes, como el antibiótico ciprofloxacino y el agente antibacteriano triclosán que son sustratos para las bombas de expulsión pero no los inductores de su expresión. La exposición prolongada a concentraciones sub-letales de tales agentes seleccionaría líneas de la célula mutante que expresan bombas de expulsión de manera constitutiva. Bajo circunstancias normales, podría esperarse que tales copias del mutante pudieran ser perjudiciales con respecto a las células de tipo silvestre pero pueden entrar en dominancia cuando los otros miembros de la comunidad sucumben al agente del tratamiento. Claramente, en tales circunstancias, el mutante de la expulsión seleccionado podría ser menos competitivo pero tiene resistencia múltiple a varios agentes. <sup>(14,34)</sup>

### 1.4.3.-Mecanismos de resistencia fúngica a los biocidas

Se conoce muy poco sobre los mecanismos de resistencia fúngica (tabla 2) a antisépticos y desinfectantes. <sup>(14)</sup>

TIPO DE RESISTENCIA	MECANSIMO POSIBLE	EJEMPLOS
Intrínseca	Exclusión	Clorhexidina
	Inactivación enzimática	Formaldehído
	Modulación fenotípica	Etanol
	Expulsión	Hasta ahora no demostrado*
Adquirida	Mutación	Algunos conservadores
	Expulsión inducida	Algunos conservadores*
	Respuesta mediada por plásmidos	Hasta ahora no demostrada

**Tabla 2.-**Posibles mecanismos de resistencia fúngica a desinfectantes y antisépticos (Ref. 14)



En general, se pueden distinguir también dos mecanismos de resistencia:

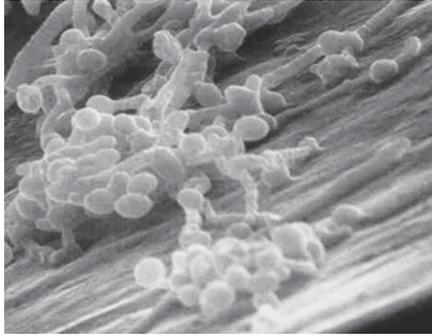
**I) Resistencia intrínseca.** En una forma de resistencia intrínseca, la pared celular presenta una barrera para reducir o excluir la entrada de un agente antimicrobiano. Hasta hoy la información disponible vincula al glucano de la pared celular, espesor de la pared y la porosidad relativa con la susceptibilidad; además en estado estacionario (cultivos viejos), es más resistente a clorhexidina que las células en fase de crecimiento logarítmico (cultivos jóvenes). <sup>(14)</sup>

Se ha observado que la membrana plasmática de las levaduras presenta varios niveles de sensibilidad al etanol dependiendo de las condiciones de crecimiento y de su composición; así, las levaduras con membrana rica en ácido linoleico son más resistentes al etanol que las enriquecidas con ácido oleico, lo cual permite inferir que una mayor fluidez en la membrana tiene cierta implicación en la resistencia. <sup>(3)</sup>

*Candida sp* ha emergido como un importante patógeno nosocomial, y se ha detectado frecuentemente la asociación entre la formación de biofilm en implantes con las infecciones de estos. La formación del biofilm fúngico (figura 10) es un fenómeno diverso y complejo; se ha estudiado con más detalle en *Candida albicans* que en otras especies y consta de tres fases:

- 1) Adherencia de las levaduras sobre la superficie del dispositivo (fase primaria)
- 2) Formación de la matriz con dimorfismo celular: levaduras e hifas
- 3) Incremento de la matriz en las tres dimensiones (fase de maduración)

La maduración completa del biofilm tiene una mezcla de morfología celular que consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas en una matriz de polisacáridos, carbohidratos, proteínas y otros componentes. La formación y estructura del biofilm en *Candida sp* esta influenciada por la naturaleza de la superficie de contacto, factores ambientales como la concentración de glucosa, de la morfología y especie que se trate. <sup>(38)</sup>



**Figura 10.** Microfotografía de la formación in vitro de biofilm sobre la superficie de un catéter vascular por *Candida albicans*. (Ref. 38)

Con respecto a la resistencia a antimicrobianos los organismos en el biofilm se comportan diferentemente de las células libremente suspendidas. Las células bacterianas y *Cándida sp* dentro del biofilm son notablemente resistentes a agentes antimicrobianos. Se ha informado que el biofilm de *Candida albicans* en discos de PVC es 30 a 2,000 veces más resistente a fluconazol, amfotericina B, flucitosina, que las células en suspensión y la estructura del biofilm permanecía intacta a una concentración de 11 veces la CMI de anfotericina B. <sup>(38)</sup>

**II) Resistencia adquirida.** Respecto a la resistencia adquirida, no hay evidencia hasta la fecha, de la existencia de algún mecanismo de expulsión, mutaciones o de mecanismos mediados por plásmidos. Sin embargo, entre los mecanismos considerados en el desarrollo de la resistencia a los azoles se han encontrado genes que codifican para bombas de expulsión de drogas pertenecientes a la superfamilia de los transportadores ATP-cassettes (ABC), como son CDR1 y CDR2; y un transportador de la superfamilia del facilitador mayor (MFS), denominado MDR1. Ambas clases de transportadores por su relación con las bombas de expulsión bacterianas pudieran ser implicadas en la expulsión de biocidas; sin embargo, hasta el momento esté fenómeno no existe ningún estudio que lo demuestre. <sup>(14,61,68)</sup>



## II.- JUSTIFICACION

Las infecciones nosocomiales son padecimientos adquiridos en el hospital y que no tenía el paciente a su ingreso, afecta en mayor medida a los pacientes con un grado mayor de inmunosupresión, generándole complicaciones que requieren una gran cantidad de recursos económicos y un mayor tiempo de atención hospitalaria. En algunos casos inclusive puede llevar a la muerte del paciente.

Los microorganismos causantes de infección nosocomial son transportados de un paciente a otro por diferentes rutas, siendo la transmisión por contacto persona a persona (personal de salud-enfermo) la más frecuente. Este mecanismo de contagio presume la contaminación de las manos del personal de salud desde otro paciente o desde un objeto con el cual las manos tienen un contacto frecuente (chapas, manijas, jaladeras, contactos eléctricos, teléfonos, etc.).

Un estudio reciente demostró que la eficacia de la limpieza hospitalaria es casi nula debido a que el personal de intendencia no conoce el ciclo de diseminación de las bacterias. Como resultado del estudio se observó ampliamente que en ningún momento, este personal limpia los puntos de contacto múltiple perdurando el riesgo de contaminación para personal médico y de enfermería.

El uso de biocidas (antisépticos y desinfectantes) en el proceso de limpieza permite eliminar las bacterias adheridas a las superficies y disminuir su concentración a cantidades de bajo riesgo para la salud.

Otro de los problemas es que el comité de vigilancia y control de infecciones nosocomiales, no tiene información veraz que le permita conocer la susceptibilidad de las bacterias que generan infección nosocomial a los biocidas y si su empleo por largos periodos lleva a la diseminación de progenies más resistentes. Esta información es esencial para tomar decisiones de no emplear un desinfectante o antiséptico y promover el uso de otro.



En el Hospital Infantil de Morelia la tasa de infección nosocomial durante el año 2006 fue de 3.3 (casos por cada 100 egresos) de un total de 5,027 egresos hospitalarios y los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos microorganismos, se han reportado en la mayoría de la literatura como patógenos oportunistas que pueden encontrarse distribuidos en el ambiente hospitalario y en dispositivos como catéteres y ventiladores, además poseen mecanismos que les han permitido resistir la presión selectiva que ejercen los antibióticos y otros antimicrobianos como los biocidas.

La capacitación del personal de intendencia ha permitido que se disminuya la contaminación en puntos de contacto múltiple, quedando pendiente la cuestión sobre si las bacterias que sobreviven al procedimiento de limpieza son aquellas con mayor resistencia a los antisépticos y desinfectantes usados.

Esto nos lleva a considerar que las bacterias que sobreviven en los puntos de riesgo son las mas resistentes y al permanecer en ellos contaminan las manos del personal y por lo tanto generan la infección nosocomial, si esta consideración es correcta debemos preguntarnos ¿Existe una diferencia significativa en la resistencia a desinfectantes y antisépticos entre las bacterias que generan infección nosocomial y bacterias no expuestas a estos agentes? Si hay una diferencia significativa, entonces nos plantearíamos la siguiente pregunta: ¿Un mayor tiempo de exposición al desinfectante garantiza la eliminación de las bacterias en los puntos de contacto múltiple? Y finalmente si se determina una diferencia significativa, ¿puede permitir este conocimiento tomar la decisión de no emplear aquellos antisépticos y desinfectantes con mayor resistencia y promover el uso de aquellos con una mayor actividad?



## **III.- HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS NULA**

Las bacterias causantes de Infección Nosocomial no poseen una resistencia significativa en comparación con aquellas no expuestas a estos agentes.

### **HIPÓTESIS ALTERNA**

La determinación del nivel de resistencia a los antisépticos y desinfectantes en bacterias causantes infección nosocomial, permitirá tomar decisiones para el uso adecuado de los mismos.



## IV.- OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Analizar si hay una diferencia significativa en la resistencia hacia los antisépticos y/o desinfectantes entre cepas de bacterias causantes de infección nosocomial y cepas no expuestas a estos agentes.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar si existe diferencia significativa entre la resistencia mostrada por cepas causantes de infección nosocomial y cepas de referencia ATCC.
  
- ❖ Determinar si un tiempo de exposición mayor al agente biocida genera una mayor inhibición del crecimiento.
  
- ❖ Evaluar la utilidad de los resultados obtenidos por el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como herramienta para la toma de decisiones para que el control de los antisépticos y desinfectantes empleados en el hospital.



## V.- METODOLOGIA

Para comprobar nuestros objetivos se diseñó un proyecto de investigación con las siguientes características:

**TIPO DE ESTUDIO:** Experimental, Longitudinal y Ambiepectivo

**UNIVERSO DE TRABAJO:** Cepas de bacterias aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en los distintos servicios del Hospital Infantil de Morelia así como de muestras ambientales recolectadas en distintas áreas del hospital.

**PERIODO DE TIEMPO:** mayo 2005 - diciembre 2006

**FUENTES DE INFORMACION:** bitácoras de registro del Laboratorio de Investigación en Microbiología, archivo de la Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (UVEH) y expedientes clínicos.

**ANALISIS DE RESULTADOS:** los resultados se valoraron utilizando números absolutos, porcentajes y tablas. Para determinar la significancia estadística se realizó un tratamiento mediante el test  $\chi^2$  (ji cuadrada).

### TIPO DE CEPAS

Se estudiaron cepas ambientales procedentes de llaves de tarja, dispensador de papel, etc., y cepas obtenidas de aislamientos clínicos (orina, secreción faríngea, sangre, punta de catéter...) identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Candida sp.*

### MATERIAL Y REACTIVOS

A) Placas para microtitulación con fondo en "u", micropiteta multivolumen y puntas para micropipeta estériles.

B) Solución salina al 0.9% para realizar las suspensiones bacterianas, así como las diluciones de los biocidas.



C) Los biocidas (antisépticos y desinfectantes) se utilizaron como la fórmula comercial (Cloruro de Benzalconio, Agua superoxidada, Peróxido de Hidrógeno, Yodopovidona) o diluyeron con agua destilada en caso de ser necesario (Cloro 1%, Glutaraldehído 2%, Isopropanol 70%).

D) Los subcultivos de cada pozo en la determinación de la CMI, se realizaron en agar de Mueller-Hinton (Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*), agar de Mueller-Hinton adicionado con extracto de levadura (*Staphylococcus sp*, *Enterococcus sp*) y de agar dextrosa de Sabouraud (*Candida sp*).

E) Las cepas bacterianas se mantuvieron viables en medio de Base de Agar Sangre, agar Sangre de Carnero y las levaduras en medio de agar Dextrosa Sabouraud.

F) Para enriquecer las cepas bacterianas antes de cada ensayo se cultivaron en caldo soya-tripticosa y las levaduras en caldo dextrosa de sabouraud; posteriormente se sembraron en agar Mueller-Hinton, agar Sangre de carnero o agar dextrosa de Sabouraud.

## PROCEDIMIENTO

### 1) Para determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria:

Se utilizó la metodología propuesta por el CLSI (M7-A7 Métodos de dilución para estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana para bacterias de crecimiento aeróbico); aunque está descrita para utilizarse en ensayos con antibióticos, se adaptó para realizar determinaciones de la CMI con los biocidas. Esta técnica nos permite determinar la mínima concentración del antimicrobiano (en nuestro caso del biocida) que inhibe el crecimiento de las bacterias y por consiguiente información sobre la resistencia a los mismos.

En una placa para microtitulación se añade a cada pocillo no1. 100µl del biocida y al resto (pocillos 2 al 11) 50µl de solución salina, realizamos diluciones dobles del biocida y el pocillo no. 12 se dejó como control de la cepa. Posteriormente la cepa joven (no más de 24hr de incubación) se suspendió en solución salina y se igualo a una turbidez de 0.5 del Nefelómetro de MacFarland, inoculamos cada



pocillo con 50µl de la suspensión y se incubó la microplaca por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este lapso de tiempo, se tomó una muestra de cada pocillo con ayuda de una asa calibrada y se depositó una gota en una caja de agar Mueller-Hinton (o del medio necesario según el microorganismo estudiado) que estaba dividida en 12 secciones (una para cada pocillo); una vez sembradas, las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas. Finalmente se registró el número de pocillo hasta el cual ya no se obtuvo desarrollo del microorganismo. Con esto determinamos que concentración del biocida correspondía a tal pocillo y por lo tanto la mínima concentración del mismo que inhibió al microorganismo ensayado. Con cada prueba se corrió la cepa control correspondiente *Escherichia coli* 25922 para enterobacterias, *Staphylococcus aureus* 25923 para cocos gram-positivos, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, y como control de *Candida sp* la cepa *Candida albicans*. (Ver figura 11)

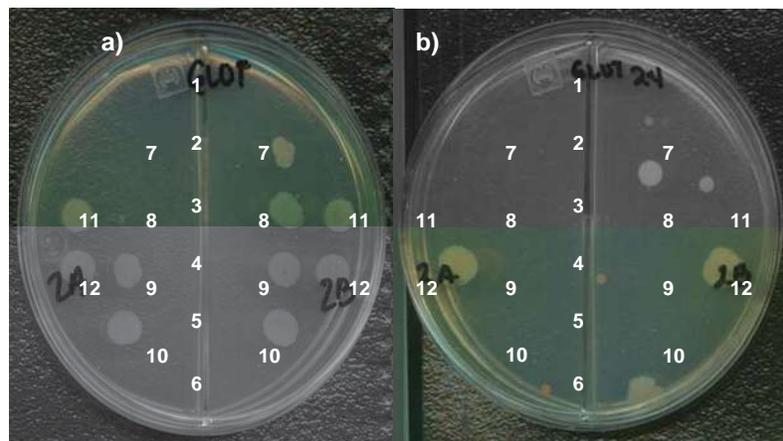


**Figura 11.-** Fotografías que muestran la técnica para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microplaca así como el resultado de los sub-cultivos en placa de agar Mueller-Hinton. La numeración en la placa de agar indica la posición del desarrollo de cada pozo.



## 2) Para valorar la influencia del tiempo sobre la acción de los biocidas

Establecimos como tiempos de contacto 15min y 24hr para todos los biocidas. Seleccionamos un grupo de cepas de cada microorganismo e igualmente se realiza el procedimiento descrito en el inciso anterior, con la diferencia de que se toma una muestra de cada pocillo a los 15min y 24 horas después de la inoculación con el microorganismo a probar. Cada cepa se ensayó por duplicado (Ver figura 12).



**Figura 12.-** Fotografías que muestran el desarrollo del microorganismo a las diferentes concentraciones del biocida en los dos tiempos ensayados a) 15min, b) 24hr. El microorganismo aquí ensayado *Pseudomonas aeruginosa* vs glutaraldehído 2%. La numeración indica la posición donde se depositó la muestra de cada pocillo. Obsérvese un menor desarrollo a las 24hr.



## VI.- RESULTADOS

En total se analizaron 42 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 7 *Enterobacterias*, 9 *Staphylococcus spp.*, 10 *Candida spp* y 1 *Enterococcus spp.*

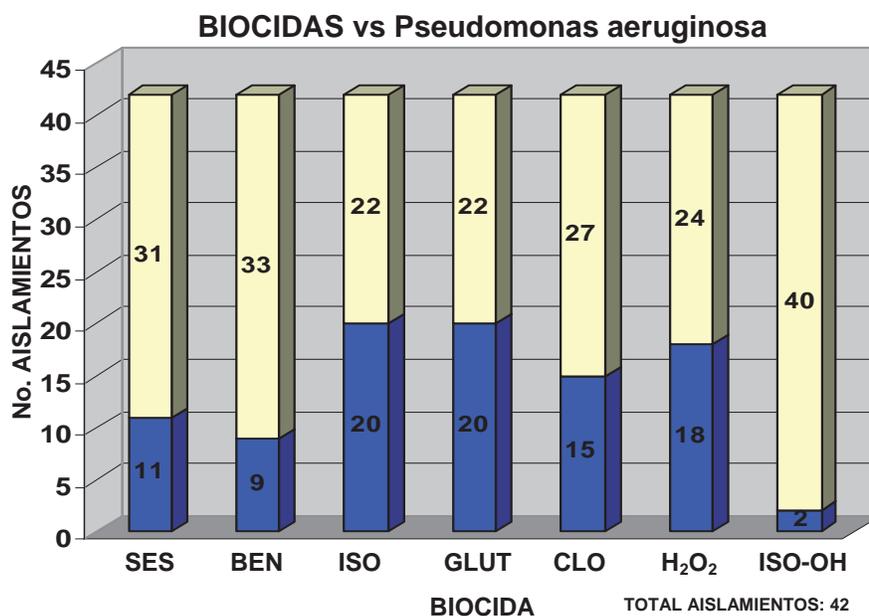
A cada una de las cepas ensayadas se determinó la CMI para cada uno de los biocidas, los resultados obtenidos se ordenaron de menor a mayor CMI para calcular la CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> para cada población de microorganismos. Estos resultados se muestran en la tabla 3 y se comparan con la CMI de cada cepa control ATCC.

**Tabla 3.-** Se muestran en la tabla las CMI promedio para cada grupo de microorganismos así como la CMI de la cepa control; podemos observar en algunos casos la gran diferencia entre ambos grupos de cepas. Si ambas CMI son muy diferentes la resistencia de las cepas hospitalarias es mayor a la cepa control.

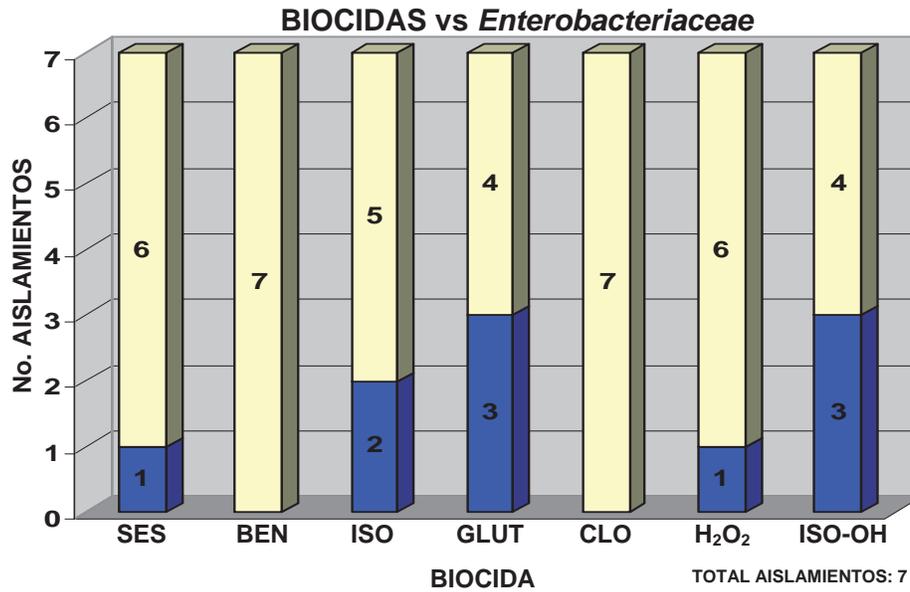
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	BIOCIDAS						Isopropand %
	Agua Superoxidada (mg/lit)	Cloruro de Benzalcorno (g/ml)	Yodopovidona (g/ml)	Glutaraldehído %	Cloro (ppm)	Peróxido Hidrógeno (g/ml)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
CMI <sub>50</sub>	0.02125	0.00008	<0.00008	0.0813	19531	0.00104	35
CMI <sub>90</sub>	0.04250	0.00016	0.00081	0.6525	39063	0.00885	35
ATCC	0.00066	0.00004	<0.00008	0.0078	19531	0.00052	875
<i>Enterobacteriaceae</i>							
CMI <sub>50</sub>	0.01063	<0.00001	<0.00008	0.0078	<97666	0.00013	35
CMI <sub>90</sub>	0.01063	<0.00001	0.00081	0.0156	<97666	0.00013	70
ATCC	0.00066	<0.00001	<0.00008	<0.0019	<97666	0.00013	70
<i>Candida sp</i>							
CMI <sub>50</sub>	0.02125	<0.00001	<0.00008	0.0078	<97666	0.00026	35
CMI <sub>90</sub>	0.04250	<0.00001	<0.00008	0.6525	39063	0.00009	35
ATCC	0.00066	<0.00001	<0.00008	<0.0019	<97666	0.00013	35
<i>Cocos Grampositivos</i>							
CMI <sub>50</sub>	0.00531	<0.00001	<0.00008	0.0078	<97666	0.00104	70
CMI <sub>90</sub>	0.02125	<0.00001	<0.00008	0.0156	<97666	0.00419	>70
ATCC	0.01063	<0.00001	<0.00008	<0.0019	<97666	0.00104	875



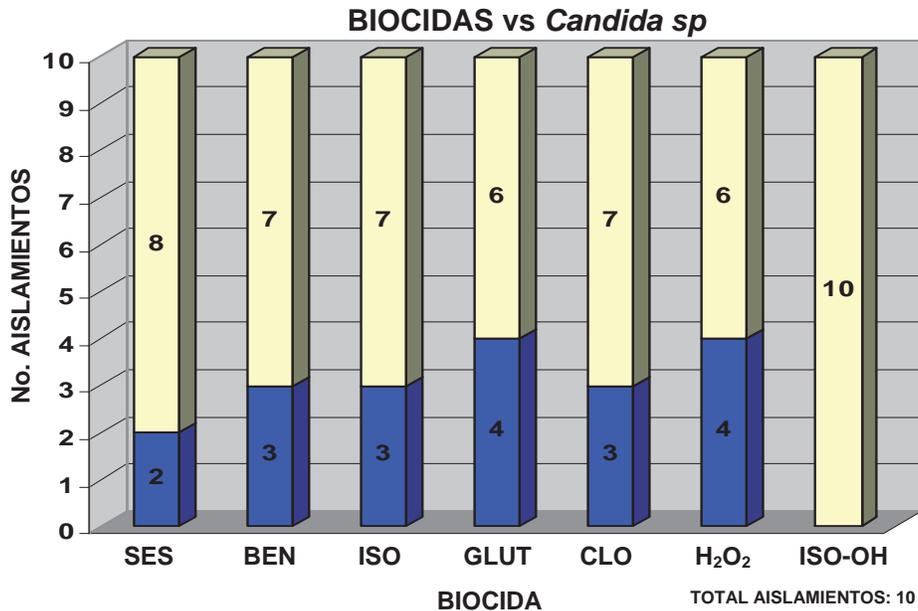
Los datos de la CMI obtenidos para cada cepa con cada uno de los biocidas ensayados se compararon frente a la CMI<sub>50</sub> determinándose el número de cepas que mostraron resistencia significativa, es decir, aquellas con una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. Estos resultados se muestran en las gráficas 1-4.



**Gráfica 1.** Comportamiento de *Pseudomonas aeruginosa* frente a los diferentes biocidas ensayados. Las barras en azul indican el número de aislamientos que presentó una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. Observamos en algunos casos (ISO, GLUT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que cerca de la mitad de aislamientos hospitalarios fueron más resistentes a la CMI promedio. SES=Agua superoxidada, BEN=Cloruro de Benzalconio, ISO=Yodopovidona, GLUT=Glutaraldehído 2%, CLO=Cloro 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Peróxido de Hidrógeno, ISO-OH=Isopropanol 70%.



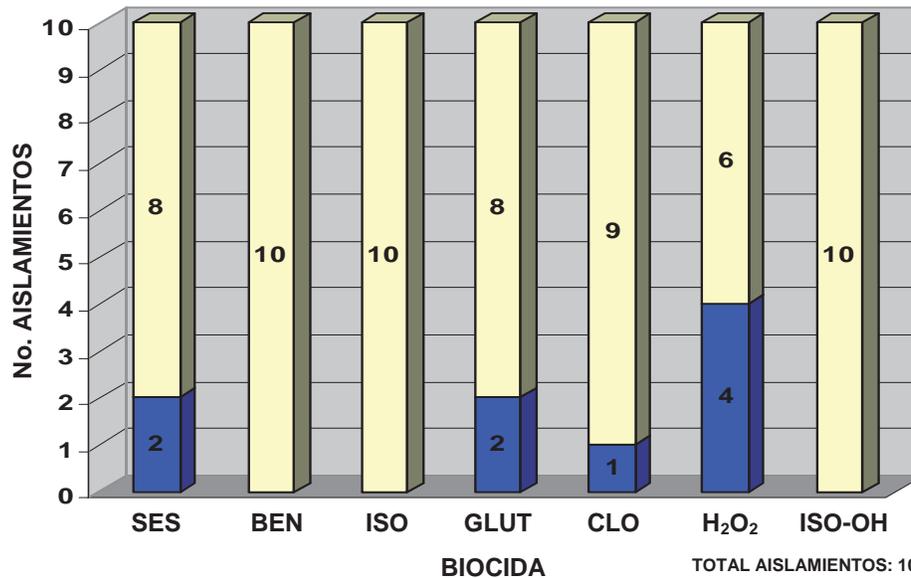
**Gráfica 2.** Comportamiento de *Enterobacteriaceae* frente a los diferentes biocidas ensayados. Las barras en azul indican el número de aislamientos que presentó una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. Observamos que GLUT, ISO-OH presentaron el mayor número de aislamientos resistentes. SES=Agua Superoxidada, BEN=Cloruro de Benzalconio, ISO=Yodopovidona, GLUT=Glutaraldehído 2%, CLO=Cloro 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Peróxido de Hidrógeno, ISO-OH=Isopropanol 70%



**Gráfica 3.** Comportamiento de *Candida sp* frente a los diferentes biocidas ensayados. Las barras en azul indican el número de aislamientos que presentó una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>, en este caso fueron GLUT y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SES=Agua Superoxidada, BEN=Cloruro de Benzalconio, ISO=Yodopovidona, GLUT=Glutaraldehído 2%, CLO=Cloro 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Peróxido de Hidrógeno, ISO-OH=Isopropanol 70%



### BIOCIDAS vs *Cocos Gram-positivos*



**Gráfica 4.** Comportamiento de los *Cocos Gram-positivos* frente a los diferentes biocidas ensayados. Las barras en azul indican el número de aislamientos que presentó una CMI mayor que la CMI<sub>50</sub>. Observamos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presenta el mayor número de aislamientos resistentes. SES=Agua Superoxidada, BEN=Cloruro de Benzalconio, ISO=Yodopovidona, GLUT=Glutaraldehído 2%, CLO=Cloro 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Peróxido de Hidrógeno, ISO-OH=Isopropanol 70%



### Test $\chi^2$ (ji cuadrado)

Se realizó un tratamiento estadístico mediante la prueba  $\chi^2$  Ji cuadrada para determinar si la diferencia en la resistencia a los diferentes biocidas ensayados entre las cepas hospitalarias y los controles con cepas ATCC era significativa. Comparándose los resultados de cada cepa hospitalaria contra los de la cepa control; son estadísticamente significativos cuando la  $\chi$  calculada es mayor a la  $\chi$  tabulada. Los datos de la columna  $\chi$  CALCULADA son el valor promedio del total de cepas ensayadas para cada grupo de microorganismos; mientras que en la columna  $\chi$  TABULADA se presenta valor percentil ( $\chi^2_{.95}$ ) para la distribución Ji-cuadrada con un grado de libertad <sup>(78)</sup>.

#### *Pseudomonas aeruginosa*

BIOCIDA	$\chi$ CALCULADA	$\chi$ TABULADA
Agua superoxidada	36.837	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.005	3.84
Yodopovidona	0.025	3.84
Glutaraldehído 2%	17.884	3.84
Cloro 1%	625.030	3.84
Peróxido de Hidrógeno	1.030	3.84
Isopropanol 70%	2635.938	3.84

#### *Enterobacteriaceae*

BIOCIDA	$\chi$ CALCULADA	$\chi$ TABULADA
Agua superoxidada	3.149	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.0	3.84
Yodopovidona	0.004	3.84
Glutaraldehído 2%	0.0370	3.84
Cloro 1%	0.0	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.003	3.84
Isopropanol 70%	70.0	3.84

#### *Cocos Grampositivos*

BIOCIDA	$\chi$ CALCULADA	$\chi$ TABULADA
Agua superoxidada	0.040	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.0	3.84
Yodopovidona	0.0	3.84
Glutaraldehído 2%	0.289	3.84
Cloro 1%	9.765	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.024	3.84
Isopropanol 70%	4287.5	3.84

#### *Candida sp*

BIOCIDA	$\chi$ CALCULADA	$\chi$ TABULADA
Agua superoxidada	33.094	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.0	3.84
Yodopovidona	0.0	3.84
Glutaraldehído 2%	4.137	3.84
Cloro 1%	576.176	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.318	3.84
Isopropanol 70%	17.5	3.84



Los datos obtenidos en los ensayos del tiempo de contacto para cada grupo de microorganismos, también se analizaron con la prueba  $\chi^2$ . Se observó una gran variabilidad en los resultados

*Pseudomonas aeruginosa*

BIOCIDA	15 min		24 hr	
	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB
Agua superoxidada	2.722	3.84	11.661	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.005	3.84	0.0002	3.84
Yodopovidona	0.001	3.84	0.001	3.84
Glutaraldehído 2%	0.332	3.84	1.188	3.84
Cloro 1%	9.765	3.84	0.0	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.021	3.84	0.009	3.84
Isopropanol 70%	140.0	3.84	425.4	3.84

*Enterobacteriaceae*

BIOCIDA	15 min		24 hr	
	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB
Agua superoxidada	2.616	3.84	0.070	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.002	3.84	0.0	3.84
Yodopovidona	0.0	3.84	0.0	3.84
Glutaraldehído 2%	1.755	3.84	0.234	3.84
Cloro 1%	87.89	3.84	0.0	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.160	3.84	0.004	3.84
Isopropanol 70%	0.0	3.84	665.0	3.84

*Cocos Grampositivos*

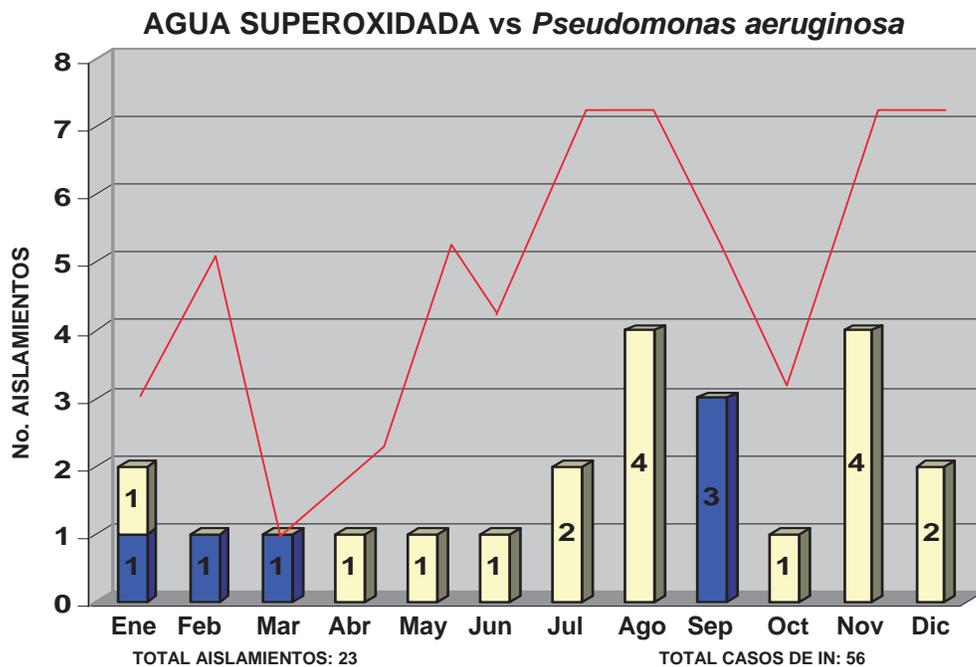
BIOCIDA	15 min		24 hr	
	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB
Agua superoxidada	0.065	3.84	0.002	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.0	3.84	0.0	3.84
Yodopovidona	0.0	3.84	0.0	3.84
Glutaraldehído 2%	0.032	3.84	0.0	3.84
Cloro 1%	0.0	3.84	0.0	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.008	3.84	0.0004	3.84
Isopropanol 70%	0.0	3.84	0.0	3.84

*Candida sp*

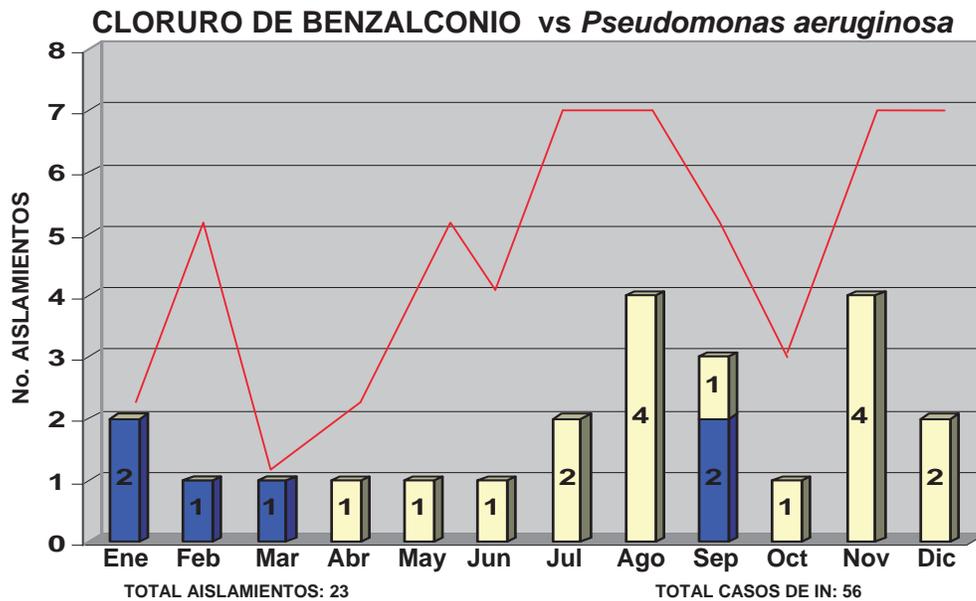
BIOCIDA	15 min		24 hr	
	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB	$\chi$ CAL	$\chi$ TAB
Agua superoxidada	0.191	3.84	0.392	3.84
Cloruro de Benzalconio	0.0002	3.84	0.0	3.84
Yodopovidona	0.0	3.84	0.0	3.84
Glutaraldehído 2%	0.173	3.84	0.91	3.84
Cloro 1%	0.0	3.84	0.0	3.84
Peróxido de Hidrógeno	0.114	3.84	0.003	3.84
Isopropanol 70%	0.0	3.84	3.157	3.84



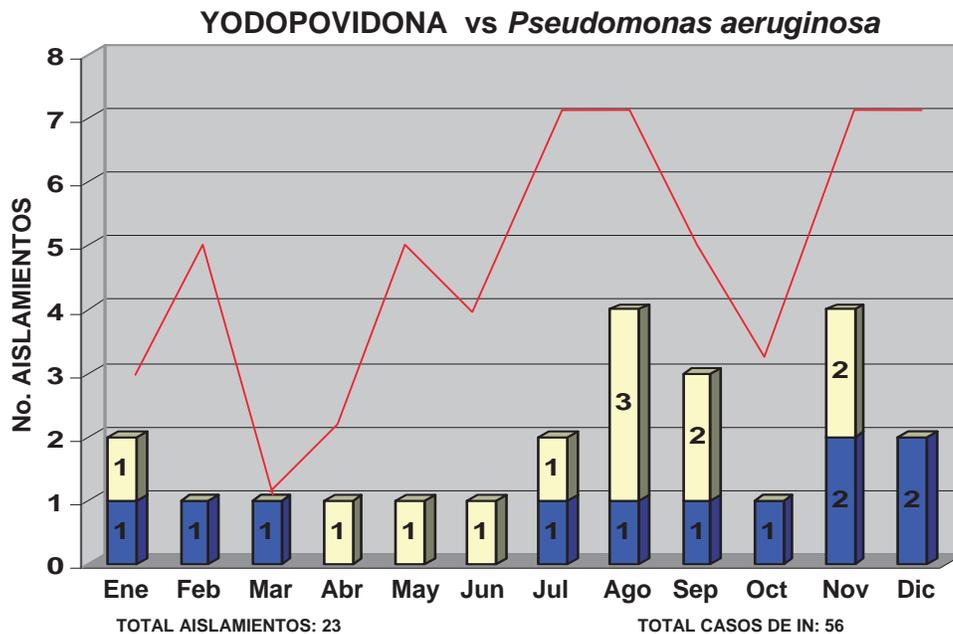
De las 42 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que se ensayaron en este trabajo 23 eran cepas aisladas de casos confirmados de infección nosocomial (IN) que se reportaron durante el año 2006; se comparó el comportamiento de estas cepas frente a los diferentes biocidas ensayados, con el número de casos de IN por esta bacteria registrados cada mes en el hospital. Observándose la presencia de aislados con resistencia significativa en los diferentes meses del año.



**Gráfica 5.-** Estudio comparativo de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* frente al Agua Superoxidada, las barras en azul indican el número de aislamientos con una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. La línea roja indica el número de casos de IN por *Pseudomonas aeruginosa* en cada mes durante el año 2006.



**Gráfica 6.-** Estudio comparativo de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* frente al Cloruro de Benzalconio, las barras en azul indican el número de aislamientos con una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. La línea roja indica el número de casos de IN por *Pseudomonas aeruginosa* en cada mes durante el año 2006.



**Gráfica 6.-** Estudio comparativo de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la Yodopovidona, las barras en azul indican el número de aislamientos con una CMI mayor a la CMI<sub>50</sub>. La línea roja indica el número de casos de IN por *Pseudomonas aeruginosa* en cada mes durante el año 2006.







## VII.- DISCUSIÓN

Algunas de las cepas aisladas de casos de infección nosocomial mostraron una diferencia marcadamente significativa en la resistencia comparada con la cepa control, esto ocurrió con el glutaraldehído frente *Pseudomonas aeruginosa* ( $CMI_{50}$  0.0313% vs  $CMI_{ATCC}$  0.0078%) y *Candida sp* ( $CMI_{50}$  0.0078% vs  $CMI_{ATCC}$  < 0.0019%). Debido a que este biocida es ampliamente utilizado en la desinfección de instrumental termosensible en el hospital podemos suponer que el aumento en la resistencia está relacionado a la selección gradual de las cepas más resistentes.

Mediante el análisis de resultados con el test ji cuadrada encontramos que la resistencia en las cepas hospitalarias difiere significativamente ( $p= 0.05$ ) de la resistencia en las cepas control; por lo tanto, los resultados obtenidos por el método de la Concentración Mínima Inhibitoria para los diferentes antisépticos y desinfectantes utilizados en el hospital si nos mostró una diferencia significativa sobre el nivel de resistencia de los microorganismos que causan infección nosocomial.

Se encontró que microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida sp* presentaron un nivel de resistencia elevado para biocidas como el glutaraldehído o el cloro, ambos utilizados en el hospital para la desinfección de instrumental quirúrgico e inmobiliario respectivamente.

Sorpresivamente observamos que la mayoría de las cepas ensayadas tanto de bacterias como levaduras, no presentaron diferencias significativa en la resistencia a biocidas como el Cloruro de Benzalconio, esto fue contrario a lo reportado en la literatura ya que tiene un pésimo historial como desinfectante y se ha informado que bacterias como *Pseudomonas sp* puede crecer como biofilm en soluciones de este desinfectante y así resistir concentraciones de hasta 2 g/litro <sup>(34)</sup>, mientras que en este estudio observamos que la  $CMI_{50}$  para *Pseudomonas aeruginosa* fue tan solo de 0.16 g/litro.



Por otro lado las diferencias en la resistencia de las cepas hospitalarias y los controles ATCC en función del tiempo de exposición a cada agente no fueron significativas en la mayoría de los casos, esto significa que la resistencia en las cepas hospitalarias expuestas a los biocidas es igual a la de cepas no expuestas. Sin embargo, observamos en el análisis estadístico que estos se elevaron ligeramente para ciertos biocidas, específicamente el glutaraldehído con *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida sp*; lo que probablemente puede estar relacionado a la selección de las células más resistentes como consecuencia de un tiempo de contacto más largo.

De las 42 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 23 cepas fueron aisladas de casos de infección nosocomial reportados durante el 2006; se comparó su comportamiento frente a los diferentes biocidas ensayados, encontrándose aislamientos con resistencia significativa en la mayoría de los meses, específicamente con la Yodopovidona, Glutaraldehído, Cloro y Peróxido de Hidrógeno. Esto nos muestra que la limpieza hospitalaria tal vez no incluye los puntos de contacto múltiple y la eliminación de los microorganismos establecidos en ellos, impidiendo romper el ciclo de contagio en las infecciones nosocomiales. Por lo tanto, los resultados si proporcionan evidencia que puede utilizar el comité para el control de infecciones nosocomiales en la toma de decisiones sobre el uso de antisépticos y desinfectantes.



## VIII.- CONCLUSION

Los datos obtenidos si mostraron que existe una diferencia significativa entre la resistencia de las cepas hospitalarias y la de cepas control ATCC, lo que nos da elementos para emplear esta información por el Comité para el control y uso de los Desinfectantes en función de la proporción de cepas que muestren resistencia con respecto al numero total de infecciones nosocomiales registradas. Por otro lado se observó que un tiempo de exposición más largo puede ser efectivo para lograr una mayor inhibición del crecimiento de las bacterias causantes de infección nosocomial, lo que nos lleva a pensar que debemos de revisar el tiempo durante el cual los puntos de riesgo están en contacto con el desinfectante durante el procedimientos de limpieza y medir su efecto directo sobre el numero de casos de infección nosocomial encontrados.



## IX.- RECOMENDACIONES

### **-Para el comité de control de infecciones nosocomiales del Hospital Infantil de Morelia**

-Utilizar los resultados de la técnica CMI para establecer un rol de uso de los diferentes biocidas utilizados en las prácticas de antisepsia y desinfección.

-Solicitar la determinación del nivel de resistencia a los diferentes biocidas utilizados cuando se sospeche que la causa de un brote de infecciones nosocomiales esté relacionada a la preparación de soluciones antisépticas o a la desinfección de instrumental quirúrgico

-Monitorizar y validar el uso de los biocidas eliminando aquellos que han perdido actividad frente a los microorganismos que prevalecen como causa de infección nosocomial.

### **-Para la Secretaría de Salud**

-Promover la introducción de nuevos productos biocidas en sustitución de aquellos eliminados por la elevada resistencia que presentan los microorganismos al mismo.

-Tomar los resultados para el control y vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales y así establecer políticas de regulación y uso correcto de los biocidas



## X.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prescott, LM., Harley JP., Klein, DA. 2003. Microbiología. 4a Edición. México DF: McGraw-Hill Interamericana ed. 1005 p.
2. Sánchez Saldaña, L., Sáenz Anduaga, E. 2005 Antisépticos y Desinfectantes. Derm. Peruana 15(2): 82-103
3. Hernández, RA. 2006. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. Tesis de Doctorado. Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona. España. 235p
4. Henao Riveros, SC., Sierra Parada, CR., Gaitán Alvarez, JA. 2003 Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Rev Fac Medicina UNAL 51(3):136-142
5. Suárez del Castillo, E., Rabaza Pérez, A., Díaz Alfonso, G. 2002 Nuevo sistema de desinfección por vapor fluente a baja temperatura. Enf Infec y Micro 22(1): 31-38
6. Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. 10a Edición. Madrid, España: Pearson Prentice-Hall ed. 1011p
7. Coria Lorenzo, JJ., Gómez Barreto, D., Saavedra Barrios, MA. 2005. Avances en el control de infecciones nosocomiales en el paciente pediátrico. 2a Edición. México, DF: Medicina y Mercadotecnia ed. 308p
8. [http://www.ergomix.com/acerca\\_rotación\\_desinfectates\\_ilender\\_articulos\\_276\\_AVG-htm](http://www.ergomix.com/acerca_rotación_desinfectates_ilender_articulos_276_AVG-htm)
9. Savino, MJ. Actividad de sales de amonio cuaternario sobre bacterias alterantes de alimentos y/o patógenas para el hombre. <http://www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UNT/AgA%20savino.doc>
10. Forbes, BA., Sahm, DF., Weissfeld, AS., 2002, Bayley-Scott: Diagnóstico Microbiológico. 11a Edición. Médica Panamericana ed.
11. Ryan, KJ., Ray, CG., 2004. Sherris: Microbiología Médica. 4a Edición. McGraw Hill ed. 1059p
12. Jawetz, E., Melnick, JL., Adelberg, EA. 1987. Microbiología Médica. 12a Edición. El Manual Moderno ed.



13. Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R., 1999. Microbiología Médica. 2a Edición. Harcourt Brace ed.
14. McDonnell G., Russell, D. 1999 Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin. Microb. Reviews 12(1) 147-179
15. Espinal López, AN. 2004. Incidencia de infecciones nosocomiales en pacientes quirúrgicos de ortopedia, Hospital-Escuela "Oscar Danilo Rosales A." septiembre-noviembre 2003. Tesis de especialidad. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Nicaragua. 50p
16. Pascuzzo Lima C., Antisépticos y desinfectantes. [http://www.geocities.com/uec\\_cdchtAntisep.doc](http://www.geocities.com/uec_cdchtAntisep.doc)
17. Acosta Gío, E., Herrero Farías, A., Mata Portugués, VH. 2001 Cloruro de benzalconio: inaceptable para esterilizar o desinfectar instrumental médico o dental. Sal. Pub. México 43(6): 570-573
18. Martínez, FP. 1997, Integrones. Nueva causa de resistencia a antibióticos. Rev. Esp. Quimioterapia 10: 191-194
19. Ida, T., Okamoto, R., Nonoyama, M., Irinoda, K., Kurazono, M., Inoue, M. 2002 Antagonism between aminoglycosides and B-lactams in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme. Antim. Agents Chemother. 46(5): 1516-1521
20. Gruteke, Paul., Goessens, W., van Gils, J., Peerbooms, P., et al. 2003 Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum B-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of Klebsiella pneumoniae causing a nosocomial outbreak. Antim. Agents Chemother. 41(3): 1161-1166
21. Martínez Rodríguez, JM. 2005 Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23(1): 25-31
22. Coque Gonzalez, MT. 2005 Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23(5) 251-253



23. Cabrera, CE., Gómez, RF., Zúñiga, AE. 2007 La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación Colombia Médica 38(2): 149-158
24. Mella M., S., Sepúlveda A., M., González R., G., Bello T., H., Domínguez Y., M., Zemelman Z., R., Ramírez G., C. 2004 Aminoglucósidos-aminociclitolos: características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Rev. Chil. Infectología 21(4): 330-338
25. Silva Sánchez, J. 2006 Resistencia a antibióticos. Rev. Lat. Microbiología 48(2):105-112
26. Baquero, F., Cantón, R., García del Castillo, M., Baquero MR., Oliver, A., Blázquez, J. 2003 Adaptación global de *Pseudomonas aeruginosa*: temas comunes de resistencia a antibióticos y patogenicidad. Rev. Esp. Quimioterapia 16(sup.1)
27. Nuñez, L.; Moreton, J. 2006 Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. Hig. Sanid. Ambiental 6(1): 197-201
28. Reynaldo M., Flores M., Viegas Caetano J., Magariños M. 2004 Eficacia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la metilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Panam. Salud Pública 16(3): 187-192
29. Narváez E., Alvarez M., Guíñez J., Atencio L. 2005 Susceptibilidad a antibióticos y metales pesados y perfil plasmídico en *Escherichia coli*. Bol. Centro Invest. Biológicas 39(1)
30. Sagripanti, JL., Bonifacino, A. 1996 Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. Ap. Environ. Microbiology 62(2): 545-551
31. Ochsner, UA., Hazte, DJ., Vasil, ML. 2001 Genetic and physiological characterization of *ohr*, encoding a protein involved in organic hydroperoxide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology 183(2): 773-778
32. Gajadhar, T., Lara, A., Sealy, P., Adesiyun, AA. 2003 Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad. Rev. Panam. Salud Pública 14(3): 193-200



33. Fang, CT., Chen, HC., Chuang, YP., Chang, SC., Wang, JT. 2002 Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antim. Agents Chemother.* 46(6): 2024-2028
34. Meter, G., McBian, AJ. 2003 Potencial impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Micr. Reviews* 16(2): 189-208
35. Tabata, A., Nagamune, H., Maeda, T., Murakami, K., Miyake, Y., Kourai, H. 2003 Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antim. Agents Chemother.* 47(7): 2093-2099
36. Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, M., Heir, E. 2003 Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus intermedius*. *Antim. Agents Chemother.* 47(10): 3046-3052
37. Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. 2006 Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antim. Agents Chemother.* 50(1) 43-48
38. Kojic, EM., Darouiche, RO. 2004 *Candida* Infections of medical devices. *Clin. Micr. Reviews* 17(2): 255-267
39. Watnick, P., Kolter, R. 2000 Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriology* 182(10): 2675-2679
40. Lewis, K. 2001 Riddle of biofilm resistance. *Antim. Agents Chemother.* 45(4): 999-1007
41. Mdluli, KE., Witte, PR., Kline, T., et al. 2006 Molecular validation of LpxC as an antibacterial drug target in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Agents Chemother.* 50(6): 2178-2184
42. Murga, R., Millar, JM., Donlan, RM. 2001 Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. *J. Clin. Microbiology* 39(6): 2294-2297



43. Anderl, JN., Zahller, J. Roe, F., Stewart, PS. 2003 Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antim. Agents Chemother.* 47(4): 1251-1256
44. De Silva, GDI., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, RC., et al. 2002 The *ica* operon and the biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clinic. Microbiology* 40(2): 382-388
45. Di Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I., Piccolomini, R. 2004 Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antim. Agents Chemother.* 48(1): 151-160
46. Donlan, RM., Costerton, JM. 2002 Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinic. Micr. Reviews* 15(2): 167-193
47. Mateo Maestre, M., Maestre Vera, JR. 2004 Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Esp. Quimioterapia* 17(1): 26-28
48. Herrera Mendoza, MT. 2004 El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova* 2(2): 71-80
49. Soriano, A. 2007 Significado clínico de la resistencia antimicrobiana de las biocapas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25(7): 423-424
50. Conejo, MC., García, I., Picabea, L., Pascual, A. 2006 Expresión de porinas en *Pseudomonas aeruginosa* formando biocapas en sondas urinarias de látex siliconizado. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24(6): 405-408
51. Rodríguez Martínez, JM., Ballesta, S., Conejo, MC. Pascual, A. 2007 Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25(7): 425-428
52. V. Piddock, LJ. 2006 Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinic. Micr. Reviews* 19(2): 382-402
53. Cervantes, C. et al. 2006 Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Lat. Microbiología* 48(2) 203-210



54. Gómez Álvarez, CA.; Leal Castro, AL.; Pérez de González, MJ.; Navarrete Jiménez, ML. 2005 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Rev. Fac. Medicina UNAL* 53(1)
55. Zihra-Zarifl, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, JC., Plesiat, P. 1999 In Vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antim. Agents Chemother.* 43(2): 287-291
56. Mitchel, BA., Brown, MH., Skurray, RA. 1998 QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanilylhydrazones. *Antim. Agents Chemother.* 42(2): 475-477
57. Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T. 1999 Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Agents Chemother.* 43(2): 415-417
58. Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., Poole, K. 1998 Expression of *Pseudomonas aeruginosa* efflux pumps MexA-MEXB-Oprm and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antim. Agents Chemother.* 42(1): 65-71
59. Chollet, R., Bollet, C., Chevalier, J., Malléa, M., Pagès, JM., Davin-Regli, A. 2002 mar operon involved multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*. *Antim. Agents Chemother.* 46(4): 1093-1097
60. Ramos Aires, J., Pechère, JC., Van Delden, C., Köhler, T. 2002 Aminoacid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Agents Chemother.* 46(7): 2169-2173
61. Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, TJ., Chattopadhyay, A., Prasad, R. 2004 Membrana sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antim. Agents Chemother.* 48(5): 1778-1787
62. Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., Nombra, N. 2004 Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-



- oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Agents Chemother.* 48(4): 1320-1328
63. Chevalier, J., Bredin, J., Mahamoud, A., Malléa, M., Barbe, J., Pagès, JM. 2004 Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antim. Agents Chemother.* 48(3): 1043-1046
64. Li, XZ., Poole, K., Nikaido, H. 2003 Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antim. Agents Chemother.* 47(1): 27-33
65. Huang, J., O'Toole, PW., Shen, W., Amrine-Madsen, H., et al. 2004 Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antim. Agents Chemother.* 48(3): 909-917
66. Y. Wong, KK., L. Brinkman, FS., S. Benz, R., W. Hancock, RE. 2001 Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriology* 183(1): 367-374
67. H. Jo, JT., L. Brinkman, FS., W. Hancock, RE. 2003 Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of novel outer membrane proteins. *Antim. Agents Chemother.* 47(3): 1101-1111
68. Marchetti, O., Moreillon, P., Entenza, JM., Vouillamoz, J., Glauser, MP., Bille, J., Sanglard, D. 2003 Fungicidal of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* is not dependent on multidrug efflux transporters encoded by the CDR1, CDR2, CaMDR1, and FLU1 genes. *Antim. Agents Chemother.* 47(5): 1565-1570
69. Gayet, S., Chollet, R., Molle, G., Pagès, JM., Chevalier, J. 2003 Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antim. Agents Chemother.* 47(5) 1555-1559
70. Lee, EW., Huda, MN., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2003, EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*, *Antim Agents Chemotherapy*, Vol.47, No.12 p.3733-3738



71. White, TC., Holleman, S., Dy, F., Mirels, LF., Stevens, DA. 2002 Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antim. Agents Chemother.* 46(6) 1704-1713
72. Sánchez, P., Alonso, G., Morales, G., Linares, JF., Rojo, F., Martínez, JL. 2003 Sistemas de expulsión de drogas: mucho más que resistencia a los antibióticos. *Rev. Esp. Quimioterapia* 16(sup.1)
73. Martínez, JL., Baquero, F. 2002 Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinic Micr. Reviews* 15(4) 647-679
74. Linares Rodríguez, JF., Martínez Menéndez, JL. 2005 Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23(2): 86-93
75. Métodos de dilución para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias de crecimiento aerobio (M7-A7). 7a Edición. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)
76. Rodríguez Pérez, A., Martínez Portilla, D., Páez Cuesta, N., Rodríguez Pérez, C., 2006, Estudio de la resistencia de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales ante soluciones en uso., *Rev. Mex. Patol. Clinic.* 53(2): 119-122
77. Norma Oficial Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis-determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.
78. Spiegel, MR. 1999. Estadística. 2a Edición. México DF: McGraw Hill ed. 556p