



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Estudio de la Capacidad de Resistencia a
los Desinfectantes en Aislados de Origen
Hospitalario de *Stenotrophomonas*
maltophilia

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Rodríguez Iannuzzelli Alexandra Susana, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

TUTOR: Prof. Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA
Mayo-2012

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. Alexandra Susana Rodríguez Iannuzzelli**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Alexandra Susana Rodríguez Iannuzzelli, C.I: 16.813.599, titulado **Estudio de la Capacidad de Resistencia a Desinfectantes en Aislados de Origen Hospitalario de *Stenotrophomonas maltophilia***, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 21 días del mes de Mayo del año 2012, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Annamil Alvarez Trotta



Prof. Luis Torres



Prof. Guillermina Alonso
(Tutor)

INDICE

	Pág.
INDICE	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Clasificación de los biocidas	3
1.2 Clasificación de los desinfectantes según su actividad	4
1.3 Factores que afectan la eficacia de la actividad de los antisépticos y desinfectantes	6
1.4 Mecanismos de acción	7
1.4.1 Resistencia de los microorganismos a los desinfectantes.	9
1.4.2 Resistencia intrínseca de las bacterias Gram negativas	10
1.4.3 Mecanismos de resistencia bacteriana adquirida	12
1.5 Compuestos de Amonio Cuaternario (QAC)	13
1.6 Compuestos con Polimetilen diurea	15
1.7 Resistencia a los antibióticos	17
1.8 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
2. ANTECEDENTES	24
2.1 Antecedentes Internacionales	24
2.2 Antecedentes Nacionales	28
3. JUSTIFICACIÓN	32

4.	OBJETIVOS	33
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1	Material biológico	34
5.2	Soluciones	36
5.3	Crecimientos de los cultivos bacterianos en presencia de los agentes desinfectantes a diferentes concentraciones	38
5.3.1	Prueba de Rapidez de Muerte Celular	38
5.3.2	Prueba de Suspensión Cuantitativa	40
5.4	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	42
5.5	Realización de Antibiogramas	43
6..	PLAN DE TRABAJO	45
7.	RESULTADOS	46
7.1	Curva de crecimiento	46
7.2	Crecimientos de los cultivos bacterianos en presencia de los agentes desinfectantes a diferentes concentraciones	47
7.2.1	Prueba de Rapidez de Muerte Celular	47
7.2.2	Prueba de Suspensión Cuantitativa	53
7.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	55
7.4	Realización a los antibióticos	62
8.	DISCUSIÓN	65
8.1	Curva de crecimiento	66

8.2	Crecimientos de los cultivos bacterianos en presencia de los agentes desinfectantes a diferentes concentraciones	68
8.3	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	70
8.4	Resistencia a los Antibióticos	75
9.	CONCLUSIONES	81
10.	RECOMENDACIONES	83
11.	BIBLIOGRAFÍA	84

INDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Antisépticos y Desinfectantes comúnmente utilizados	3
Tabla 2	Características diferenciales entre desinfectantes y antisépticos contra los antibióticos.	5
Tabla 3	Clasificación de los antisépticos y desinfectantes con respecto a su mecanismo de acción	9
Tabla 4	Mecanismos de resistencia intrínseca a desinfectantes y antisépticos	11
Tabla 5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> aisladas del Hospital Clínico Universitario.	34
Tabla 6	Antibióticos utilizados para la prueba de susceptibilidad a los antibióticos	44
Tabla 7	Capacidad de crecimiento de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del producto con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%. Fase Exponencial	48
Tabla 8	Capacidad de crecimiento de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del producto con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%. Fase Estacionaria	49
Tabla 9	Capacidad de crecimiento de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del producto con el agente activo Polimetilen diurea al 5%. Fase Exponencial	50
Tabla 10	Capacidad de crecimiento de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del producto con el agente activo Polimetilen diurea al 5%. Fase Estacionaria	51
Tabla 11	Crecimiento de los aislados <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> que fueron capaces de crecer con el producto comercial, evaluados por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%.	53
Tabla 12	Crecimiento de los aislados <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa con Polimetilen diurea al 5%	54
Tabla 13	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10% en fase exponencial de crecimiento	55
Tabla 14	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10% en fase estacionario de	57

	crecimiento	
Tabla 15	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del agente activo Polimetilen diurea al 5% estado exponencial de crecimiento.	58
Tabla 16	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en presencia del agente activo Polimetilen diurea al 5% estado estacionario de crecimiento.	59
Tabla 17	Diluciones a las que los aislados fueron capaces de resistir cuando se encontraban en presencia de los desinfectantes ensayados en este estudio	61
Tabla 18	Fenotipo de resistencia de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> a los antibióticos ensayados	63
Tabla 19	Aislados de <i>S.maltophilia</i> positivos para la presencia de BLEE.	64
Tabla 20	Resumen de los resultados de las pruebas a los aislados <i>S. maltophilia</i>	64

INDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Estructura química de los Compuestos de Amonio Cuaternario.	13
Figura 2	Representación del mecanismo de acción de compuestos de amonio cuaternario (QAC).	15
Figura 3	Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos	19
Figura 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . Colonia amarilla verdoso en MacConkey.	21
Figura 5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en medio agar sangre	21
Figura 6	Áreas de las cuales fueron recolectadas las muestras	36
Figura 7	Protocolo seguido para la determinación de la resistencia de los aislados bacterianos por medio de la Prueba de Rapidez de Muerte Celular	39
Figura 8	Protocolo a seguir para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de las cepas por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa.	42
Figura 9	Protocolo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados evaluados en este estudio.	43
Figura 10	Protocolo para determinar la resistencia a antibióticos de los aislados evaluados en este estudio de <i>S. maltophilia</i> .	44
Figura 11	Representación Gráfica de las fases de crecimiento de los aislados de <i>S. maltophilia</i>	46
Figura 12	Porcentajes de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> resistentes a los diferentes desinfectantes ensayados.	52
Figura 13	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de cada uno de los aislados bajo la presencia de los dos desinfectantes, cuando se encontraban en fase estacionaria.	61
Figura 14	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de cada uno de los aislados bajo la presencia de los dos desinfectantes, cuando se encontraban en fase exponencial	62

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones de microorganismos

IBE: Instituto de Biología Experimental

E. coli: *Escherichia coli*

gr: Gramos

HCU: Hospital Universitario de Caracas

LB: Luria Bertani

LBP: Laboratorio de Biología de Plásmidos

Lb: Libras

LEV: Levofloxacina

mL: Mililitro

min: Minutos

μl: Microlitros

°C: Grados centígrados

Pag: Páginas

QACs: Compuestos de Amonio Cuaternario

S. maltophilia: *Stenotrophomonas maltophilia*.

SB: Aislado de Pacientes

SN: Servicio de Neonatología

STX: Trimetopim-Sulfametoxazol

UTI: Unidad de Terapia Intensiva

DEDICATORIA

*A mi Nonna, que siempre fuiste un ejemplo a seguir enseñándome que
con fuerza, constancia y amor por las cosas, todo se logra.*

*Con todo el cariño del mundo, te dedicó este logro, espero que desde el
cielo lo disfrutes tanto como yo.*

*A mis maravillosos Padres (Victor y Assunta), por ser fuente de
energía y motivación, ya que sin ustedes no hubiera podido estar aquí,
porque sí, ustedes me dieron el regalo más bonito, el regalo de la vida.*

Dios no pudo darme mejores Padres.

Los amo de todo corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, Ser Supremo, mi eterno agradecimiento por protegerme todos los días de mi vida y permitirme llegar hasta donde he llegado.

A mi Padres Amados, que siempre me han dado su apoyo incondicional y me han guiado por el buen camino. A mi Mami, un ser maravilloso, que me enseñó a luchar y darme cuenta que en la vida hay tropiezos, pero que el levantarse es lo que cuenta, por siempre creer en mí y tener una palabra de aliento, por apoyarme cuando yo misma creía que era imposible, en fin por ser la mejor madre del mundo te doy las gracias. A mi Padre, que a pesar de la distancia siempre has estado atento para saber cómo iba mi proceso, por ser como eres, por confiar en mí y enseñarme que lo que uno se propone lo logra, por tu motivación constante y por ese gran amor que me has dado siempre, eres un hombre maravilloso para mí, en fin gracias a ambos, los amo, ustedes hicieron que este sueño fuera posible.

A mi peque Agatha (Mi perrita), mi gran compañera, el mejor regalo que hace unos años recibí, eres la que me haces sonreír con solo menear la colita. Te adoro mi peque.

A mi primo Miguel, por estar ahí a pesar de las todas las cosas, has sido una gran ayuda para mí y para mi madre.

A Lorena Colmenares, que más que una amiga se ha convertido en una hermana para mí, y doy gracia a una persona porque sin saberlo hizo que esta amistad se diera, gracias por acompañarme en estos años, por brindarme esta amistad, por estar presente tanto en las cosas buenas, como en las no tan buenas y participar en cada una en mis locuras, que no son muchas, pero las hay, por eso y mucho más, le ruego a Dios que esta amistad siga creciendo. Te adoro ami.

A Ines Aguirre, que a pesar del poco tiempo, te has convertido en una Gran Amiga, gracias ami, por estar en los momentos que te he necesitado, por brindarme tu apoyo, tus locuras y sobretodo tu amistad.

A La Mejor Tutora que he podido tener, la profesora Guillermina Alonso, por aceptarme hace unos años como una de sus tesis, dándome esta oportunidad, su gran apoyo, su tiempo, dedicación, sus conocimientos y bueno sí, a veces sus regaños. Es una persona admirable y sin usted este logro no hubiera estado completo. Gracias por confiar en mí y por hacer que esto que sabe que me ha costado se hiciera realidad. La Quiero Mucho Profe.

A la familia Magallanes, en especial a mi Argelís, por aguantarme todos estos años, por considerarme parte de su familia, por sus consejos, su apoyo y ayuda cuando lo he necesitado. Los quiero.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, Giovanni, Yusibeska, y María Alexandra, con quienes tuve la oportunidad de compartir, gracias por la ayuda que me brindaron, por mis eternas preguntas y dudas, por esos minutos que se tomaron en algún momento para explicarme algo. Gracias por hacer que estos años en el laboratorio de Biología de Plásmidos una de las mejores etapas de mi vida.

A cada uno de los profesores, que formaron parte de este aprendizaje, brindándome sus conocimientos, su atención para que hoy en día pudiera hacer uno de mis grandes sueños realidad, después de tantos años, lo logre y sobre todo a Tí profe Alicia porque aparte de todo eso mencionado, me has brindado tu amistad y tus consejos. También quiero aprovechar para agradecer al cafetín de Danny que es para mi parte esencial de la facultad y por supuesto a Danny y a José, que son la esencia de ese cafetín, por esas pláticas, por momentos, por los cafés y por el después te pago Danny que ando pelando, de verdad gracias, porque hicieron ameno todo este tiempo en la universidad.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas y a Tí, que sin esperar nada a cambio compartieron pláticas, conocimientos y que de una u otra manera ayudaron para que este sueño se convirtiera en realidad

RESUMEN

Stenotrophomonas maltophilia es un patógeno emergente de gran impacto en términos de salud pública y se ha reportado como la causa de muchas infecciones nosocomiales, especialmente en las áreas de Cuidados Intensivos. *Stenotrophomonas maltophilia* es reconocida por presentar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos como son los antisépticos y desinfectantes, estos son ampliamente utilizados en los hospitales y los consultorios médicos, donde tienen un papel fundamental para el control y la prevención de las infecciones nosocomiales, siendo aplicados en gran variedad de tópicos y cuidados, como lo son la antisepsia, la desinfección y la preservación. Los desinfectantes son productos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies. Las bacterias tienen o adquieren la capacidad de resistir a la acción de estos agentes desinfectantes, mediante mecanismos como son: (1) Capacidad de coagular y precipitar proteínas, (2) Alterar las características de permeabilidad celular y (3) toxicidad o envenenamiento de los sistemas enzimáticos de las bacterias. El uso cotidiano de estos productos ha traído como consecuencia que existan cepas bacterianas resistentes, principalmente en los ambientes hospitalarios.

En este trabajo se evaluó la capacidad de resistencia de aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* a la acción de diversos desinfectantes comúnmente utilizados en ambientes hospitalarios.

De los dos desinfectantes evaluados, uno presenta como agente activo el Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% y el otro producto Polimetilen diurea al 5%. Se utilizó la prueba de Rapidez de Muerte Celular (prueba cualitativa) y la Prueba de Suspensión Cuantitativa (prueba cuantitativa), la cual tiene como principio básico la exposición de una suspensión de un germen a la acción de un desinfectante en un tiempo específico, para luego ser sembrada en medio sólido. Los resultados de estas pruebas arrojaron que el 20% de los aislados analizados fueron capaces de resistir al efecto del desinfectante con agente activo Polimetilen diurea al 5% y 47% de los aislados analizados fueron capaces de crecer en presencia de los Compuestos de Amonio Cuaternario. Al realizar la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se observó que no todos los aislados fueron capaces de crecer a las mismas concentraciones, variando en relación a la fase de crecimiento. Cuando se evaluó la resistencia a los antibióticos se observó que solo un aislado fue resistente al Trimetoprin-Sulfametoxazol, encontrándose este aislado también resistente a los desinfectantes evaluados en este trabajo. Estos resultados aportan información que pueda ser utilizada para la búsqueda de soluciones conjuntas al problema de las infecciones hospitalarias, ya que permite conocer a que concentración es capaz de crecer diferentes aislados bacterianos en presencia de los desinfectantes ensayados en este trabajo que son de uso común en centros hospitalarios, por lo que se recomienda que el uso de los desinfectantes sea rotado.

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente se conoce que las bacterias pueden causar una amplia variedad de infecciones, desde aquellas que no muestran síntomas, hasta las que pueden ser fatales, aumentando de manera drástica la morbilidad y mortalidad de la población. En el siglo XX el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos (Cabrera y col., 2007).

La capacidad de controlar las poblaciones microbianas sobre objetos inanimados, como utensilios de alimentación o instrumentos quirúrgicos, tiene una importancia práctica considerable. Muchas veces es necesario eliminar todos los microorganismos de un objeto, mientras en otras ocasiones puede ser necesario solo destruir parcialmente la población microbiana (Prescott y col., 1999).

Los antisépticos y desinfectantes son muy utilizados en los hospitales y consultorios médicos, donde tienen un papel fundamental para el control y la prevención de las infecciones nosocomiales (Bello y col., 2006). Las infecciones nosocomiales, o intra-hospitalarias, son infecciones contraídas durante una estadía en el hospital que no se habían manifestado ni estaban en período de incubación en el momento del internado del paciente. Las infecciones que aparecen a más de 72 horas después del internado suelen considerarse nosocomiales.

Los desinfectantes son productos químicos capaces de inhibir o destruir microorganismos presentes sobre objetos inanimados y/o superficies. Su eficacia depende de factores como el tipo de desinfectante, tiempo de acción, temperatura, concentración del desinfectante, pH,

configuración del objeto a tratar, factores físicos y químicos del medio, presencia de materia orgánica y la naturaleza de los microorganismos presentes (McDonell y Russell, 1999).

Aunque los desinfectantes y los antisépticos han sido utilizados durante años, se conoce poco sobre el modo de acción de estos agentes, en comparación con todo lo que se conoce sobre los antibióticos, los cuales se definen como sustancias orgánicas; naturales o sintéticas, que inhiben o destruyen en forma selectiva las bacterias y otros organismos, generalmente a bajas concentraciones, y por lo general tienen blancos intracelulares específicos (McDonnell y Russell, 1999).

Los Biocidas es un término general que se utiliza para describir un agente químico, de origen sintético o semisintético; usualmente de amplio espectro, que bajo condiciones definidas y concentraciones críticas, puede inactivar o destruir células vivas de los microorganismos, en tiempos específicos (Gilbert y McBain, 2003). Los biocidas ejercen dos tipos de efectos diferentes de acuerdo a su especificidad o rango de acción como son: el bacterioestático, que se refiere a los agentes que inhiben el crecimiento bacteriano y bactericida que hace referencia a los agentes que destruyen a las bacterias (Cabrera y col., 2007). Si se hace referencia a cualquier otro tipo de microorganismos, se habla respectivamente de agentes microbiostáticos y microbiocidas. Para una sustancia química, la línea de demarcación entre el efecto microbiostático y el microbiocida, muchas veces va a depender de la concentración de dicha sustancia y el tiempo en el cual actúa (McDonnell y Russell, 1999).

1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOCIDAS

Los biocidas son clasificados según su blanco de acción y entre estos se encuentran: Los antisépticos, son biocidas o productos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos en o sobre los tejidos vivos (por ejemplo, lavado de manos y lavado quirúrgico), y los desinfectantes, son similares, pero en general son los productos que se utilizan en los objetos inanimados o superficies. Los desinfectantes puede ser esporostáticos; pero no son necesariamente esporicidas. La esterilización, se refiere a un proceso físico o químico que destruye por completo o elimina toda forma de vida microbiana, incluyendo las esporas. La preservación, es la prevención de la proliferación de los microorganismos en productos formulados, incluidos los productos farmacéuticos y los alimentos. Los biocidas también pueden ser utilizados para fines de limpieza, y la limpieza en estos casos se refiere a la eliminación física de material extraño de la superficie (McDonnell y Russell, 1999).

En la tabla 1, se muestran los diferentes tipos de antisépticos y/o desinfectantes comúnmente utilizados.

Tabla 1. Antisépticos y Desinfectantes comúnmente utilizados (Tomado de: Medina y Valencia, 2008)

Antisépticos	Alcoholes Iodo Agentes Catiónicos, aniónicos y Anfóteros Colorantes
Desinfectantes	Cloro y compuestos clorados Aldehídos Compuestos Fenólicos Ácidos y Álcalis

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS DESINFECTANTES DE ACUERDO A SU ACTIVIDAD

Los desinfectantes se clasifican según su nivel de acción en 4 niveles:

➤ Desinfectante de nivel alto (III): Agente de amplio espectro con actividad esporicida. En este grupo se podrían incluir algunos productos como son: Glutaraldehído (agente con actividad alta contra bacterias, hongos, virus y esporas), el hipoclorito sódico, el peróxido de hidrógeno (Galan, 2003).

➤ Desinfectante de nivel intermedio (II): agente que inactiva microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, las bacterias vegetativas, la mayoría de los virus y hongos, pero no se destruyen las esporas bacterianas. En este grupo se incluye el etanol y el isopropanol (Galan, 2003)

➤ Desinfectante de nivel bajo (I): este procedimiento puede inhibir o destruir a la mayor parte de las bacterias en estado vegetativo, algunos hongos y virus; pero no elimina microorganismos resistentes, tales como los bacilos de la tuberculosis o las esporas bacterianas. Los agentes químicos, como los compuestos de amonio cuaternario (QAC), son considerados como desinfectantes de baja actividad (Galan, 2003).

En la tabla 2, se muestran las diferencias principales que existen entre los desinfectantes y los antisépticos con respecto a los antibióticos.

Tabla 2. Características diferenciales entre desinfectantes y antisépticos contra los antibióticos. (Tomado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/esterilizacionydesinfeccion.pdf>)

Antibióticos	Desinfectantes y Antisépticos
1) Pueden aplicarse sobre piel, mucosa y el medio interno	1) No pueden utilizarse en el medio interno, y los desinfectantes ni siquiera sobre piel o mucosas
2) Tienden a ser selectivos para las células procariotas, no actuando sobre eucariotas	2) No poseen selectividad, actuando sobre células procariotas y eucariotas, razón por la cual no pueden usarse sobre el medio interno.
3) Actúan sobre microorganismos en multiplicación activa, ya que interfieren con algún paso metabólico.	3) Actúan sobre microorganismos en cualquier estadio metabólico (en multiplicación o no).
4) Se necesitan pequeñas cantidades para obtener el efecto deseado.	4) Se necesitan mayores concentraciones que los antibióticos para conseguir el efecto.
5) Actúan específicamente sobre bacterias y no sobre hongos, virus u otros microorganismos	5) Son tóxicos para muchos tipos de microorganismos, por ej.: bacterias, hongos, virus, etc.

Spaulding, en el año 1961, propuso una clasificación para la desinfección y la esterilización de los instrumentos clínicos que serán usados con el paciente (Hugo y Russell, 1999). Esta clasificación divide los elementos de cuidado del paciente en tres categorías, basadas en el riesgo de infección que representan, como son:

Crítica: Llamada así porque existe alto riesgo de infección, si el elemento se contamina con algún microorganismo, incluyendo las esporas. Los objetos de esta categoría son los que entran en contacto con el torrente sanguíneo o con las cavidades estériles. La mayoría de estos elementos debe esterilizarse, usualmente por autoclave.

Semicrítica: Comprende los objetos que entran en contacto con las mucosas o con la piel no intacta y deben estar libres de todos los microorganismos, excepto de un alto número de esporas bacterianas. Las membranas mucosas intactas son resistentes a la infección por esporas bacterianas, pero susceptibles frente a otros microorganismos, como el bacilo de la tuberculosis y

los virus. Los equipos de terapia respiratoria y de anestesia, los endoscopios y el aro del diafragma, entre otros, entran en esta categoría. Los elementos semicríticos deben recibir, por lo menos, una desinfección de alto nivel con esterilizantes químicos entre cada uso.

No crítica: Los elementos de esta categoría entran en contacto con la piel sana, pero no con las membranas mucosas. La piel intacta es una barrera efectiva para la mayoría de los microorganismos. En contraste con los elementos críticos y semicríticos, gran parte de los no críticos que pueden volver a usarse deben limpiarse con desinfectantes de bajo nivel o de nivel intermedio. Pueden contribuir a la transmisión secundaria de infecciones, contaminando las manos del personal de salud y el equipo médico. No obstante, hoy se considera un riesgo la transmisión de agentes infecciosos entre pacientes por la vía no crítica.

1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA EFICACIA DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES

La destrucción de los microorganismos y la inhibición de su crecimiento no se trata de un asunto sencillo, porque la eficacia de un agente antimicrobiano depende de diversos factores como son los siguientes (Prescott y col., 1999):

1. Tamaño de la población. Existe una estrecha correlación entre el tamaño de la población, la concentración del agente y el tiempo necesario para lisa una determinada fracción de la población bacteriana. Si se modifica la concentración, se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto. Refiriéndonos al tiempo, no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente.

2. Composición de la población. La eficacia de un agente varía considerablemente con la naturaleza de los microorganismos que se van a tratar porque difieren en cuanto a su susceptibilidad. Las endosporas bacterianas son más resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos que las formas vegetativas, y las células más jóvenes se destruyen normalmente con más facilidad que los organismos maduros.

3. pH. Afecta tanto la carga superficial neta de la bacteria como la ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto son más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácido; los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalino.

4. Temperatura. Normalmente, al aumentar la temperatura, aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes el aumento en 10° C supone duplicar la tasa de muerte. Por ello, con frecuencia se puede reducir la concentración de un desinfectante o esterilizante utilizándolo a una temperatura mayor.

5. Concentración. A menudo, pero no sucede siempre, cuando más concentrado este un agente químico o más fuerte sea uno físico, más rápidamente se destruirán los microorganismos. Sin embargo; la eficacia de un agente puede no estar normalmente relacionada con la concentración.

1.4 MECANISMOS DE ACCIÓN

En la actualidad se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación, o por la adquisición de plásmidos (ADN extracromosómico) o transposones (cromosomales o integrados en plásmidos), o cassettes de ADN transmisibles. Los genes de resistencia naturales presentes en plásmidos, se originan como mutaciones puntuales en

los genes blanco (sitios de acción de los productos de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias (Frost y col., 2005).

Existen diversos mecanismos, que son los principales responsables de las complicaciones actuales en el manejo de las enfermedades infecciosas, y son la razón por la cual un microorganismo puede crecer en presencia de un antimicrobiano, a pesar de que este se encuentre en las máximas concentraciones (Russell y col., 1998). Se han propuesto diversos mecanismos por medio de los cuales los antisépticos y los desinfectantes ejercen la acción antibactericida. Cualquiera que sea el tipo de células microbianas, es probable que exista una secuencia común de eventos, que comienza con 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 más importante de absorción es la membrana citoplasmática (Cabrera y col., 2007).

En general, el modo de acción de los antisépticos y los desinfectantes depende de tres mecanismos básicos: (1) Capacidad de coagular y precipitar proteínas, (2) Alterar las características de permeabilidad celular y (3) Toxicidad o envenenamiento de los sistemas enzimáticos de las bacterias. La acción depende del grupo químico presente en el compuesto activo del producto. Los desinfectantes pueden producir la muerte o la inhibición celular de las bacterias por oxidación, por hidrólisis o por inactivación de enzimas, con pérdida de los constituyentes celulares, actúan como desnaturizantes o precipitantes de proteínas, y causan la muerte celular. Los desinfectantes son más potentes, más rápidos y termoestables que los antisépticos (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los antisépticos y desinfectantes con respecto a su mecanismo de acción (Tomado de Vives y col., 2004).

Clasificación		Mecanismos de acción	
Inorgánicos	Halogenados	Yoduros	Oxidación de componentes bacterianos y precipitación de proteínas
		Cloruros	Yoduros
	Gases	Hipoclorito de sodio (agua lavandina)	Desnaturalización proteica.
		Óxido de Etileno	Inhibición irreversible de enzimas celulares
	Metales pesados	Compuestos de Mercurio:	Reacción con los grupos SH de las proteínas microbianas, inhibiendo la actividad de los sistemas enzimáticos.
		Inorgánicos:	
Cloruro de Mercurio			
	Óxido amarillo		
	Orgánicos:		
	Timerosal (<i>Merthiolate</i> ®)		
	Compuestos de Plata:		
	Nitrato de Plata		
Orgánicos	Oxidantes	Peróxido de hidrógeno	Producción de oxígeno molecular por la acción de catalasas tisulares
		Permanganato de potasio	
	Alcoholes	Etolol	Desnaturalización proteica. Precipitación de proteínas bacterianas.
	Fenoles	Fenol	
		Cresoles	
	Biguanidas	Clorhexidina	Alteración de la integridad de la membrana, y facilitación del arrastre mecánico del material contaminado.
	Detergentes	Aniónicos: Jabones	
		Catiónicos	
	Anfóteros Jabones	Desnaturalización proteica a pH alcalino.	
	Enzimático		
Aldehídos	Formaldehído	Alquilación de proteínas a pH alcalino.	
	Glutaraldehído		

1.4.1 RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS A LOS DESINFECTANTES

La resistencia bacteriana a los biocidas fue descrita en las décadas de 1950 y 1960 y ha ido en aumento. Ciertos biocidas como alcoholes, formaldehídos, biguanidas, yodoforos, aldehídos y agentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternario (QACs), la clorhexidina y el triclosán, se han comprometido como posibles causantes de la selección y persistencia de cepas bacterianas con bajo nivel de resistencia a los antibióticos. El uso generalizado de antisépticos y desinfectantes genera expectativas sobre la resistencia bacteriana provocada por la presión ambiental que ejercen los productos ya mencionados, y enfoca el interés hacia la posible resistencia cruzada con antibiótico (Russell, 2002).

Los diferentes tipos de microorganismos varían en sus respuestas a los agentes antimicrobianos como los antisépticos y los desinfectantes, debido a que presentan diferencias en cuanto a la estructura celular, composición y la fisiología. La susceptibilidad microbiana a estos agentes antimicrobianos ha sido clasificada en base a estas diferencias y ha sido extendida en trabajos recientes, debido a que los distintos tipos de microorganismos reaccionan de manera diferente, y es conveniente considerar a las bacterias, los hongos, los virus y los protozoarios separadamente (MacDonell y Russell, 1999).

1.4.2 RESISTENCIA INTRÍNSECA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

La resistencia intrínseca es una propiedad natural de las bacterias, codificada a nivel cromosomal, que les provee capacidad de resistir a la acción de múltiples antimicrobianos, o a condiciones ambientales adversas. Esta resistencia siempre es transferible a la descendencia por su naturaleza cromosómica, siendo específica para cada tipo celular (Russell, 2001).

Los mecanismos de resistencia intrínseca a los antisépticos y los desinfectantes en bacterias, se ha demostrado que son mediados por la impermeabilidad, el eflujo, por la formación de biopelículas y por la degradación enzimática. La formación de una biopelícula contribuye a la patogenicidad de determinados microorganismos y la persistencia de las biopelículas en el cuerpo humano sería la principal causa de la recurrencia de diversas infecciones (Reisner y col., 2006). Las biopelículas pueden estar constituidas por monocultivos o por policultivos de una o varias especies. Los microorganismos bajo esta condición tienen otras propiedades fisiológicas y tienden a ser menos susceptibles a la acción de los antisépticos y los desinfectantes.

Las bacterias Gram negativas por lo general son más resistentes a los antisépticos y los desinfectantes que las bacterias Gram positivas. La membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos. También existe una vía para los agentes catiónicos, como los Compuestos de Amonio Cuaternario (QAC), biguanidas y diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación (McDonell y Rusell, 1999).

La resistencia intrínseca a los bactericidas se ha demostrado para bacterias Gram negativas, esporas bacterianas, micobacterias; y bajo ciertas condiciones; en especies del género *Staphylococcus* (Cabrera y col., 2007).

Tabla 4. Mecanismos de resistencia intrínseca a desinfectantes y antisépticos.

Tipo de resistencia	Ejemplos	Mecanismos de resistencia
Impermeabilidad		
Bacterias Gram negativas	QACs, triclosan y diaminas	Barrera de la membrana externa previene la internalización de biocidas. El glicocálix puede estar involucrado
Micobacterias	Chlorhexidina, QACs Glutaraldehídos	La pared celular previene la entrada adecuada del biocida
Bacterias con esporas	Clorhexidina, QACs, fenoles	La cubierta y la corteza de las esporas provee una barrera para la entrada de biocidas
Bacterias Gram positivas	Clorhexidina	El glicocálix y mucoexpolisacárido pueden estar asociados con reducida difusión de los antisépticos

Tomado y modificado de McDonell y Russell, 1999

1.4.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA ADQUIRIDA

Como se ha reportado para los antibióticos y para los agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados, la resistencia adquirida a los antisépticos y desinfectantes también surge por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones. Estas configuraciones permiten arreglos diversos de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos y desinfectantes, que luego pueden ser transferidos juntos en un solo evento de conjugación (McDonell y Rusell, 1999).

La resistencia adquirida a los biocidas puede ocurrir principalmente por cambio en los genes que codifican para los blancos celulares o por una sobreexpresión del blanco, producto de mutaciones que afectan su regulación, por plásmidos que codifican para bombas de eflujo y/o por inactivación enzimática (Sheldon, 2005).

Los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles que transportan los genes de resistencia. Los plásmidos son fragmentos de DNA bacteriano con longitud variable, con capacidad para replicarse independiente del cromosoma bacteriano y utilizando la maquinaria genética que dispone la célula. Los transposones son secuencias de DNA (doble cadena) que pueden ser trasladados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido, o entre plásmidos, debido a un sistema de recombinación propio. Esto sumado a la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra, por la conjugación, permite la diseminación de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas, lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia. Algunos plásmidos y transposones poseen elementos génicos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos (resistencia múltiple).

1.5 COMPUESTOS DE AMONIO CUATERNARIO (QAC)

Los Compuestos de Amonio Cuaternario (QACs), poseen dos regiones en su estructura molecular, un hidrocarburo, que es hidrofóbico, y la otra región hidrofílica o polar, poseen un átomo de nitrógeno unido a 4 sustituyentes alquílicos o arílicos. El nitrógeno tiene carga positiva que se mantiene independiente del pH del medio distinguiéndolo así de los anfóteros y sales aminas (Ver Figura 1) Dependiendo de la carga o la ausencia de ionización del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en catiónicos, aniónicos, y compuestos anfóteros. Los agentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternario, son los antisépticos y desinfectantes más útiles (McDonnell y Rusell, 1999). Estos compuestos contienen por lo menos, una cadena de 8 a 25 átomos de carbonos, derivada de un ácido graso o de un derivado petroquímico. Ejemplos de este tipo de compuestos son los siguientes: Catiónicos, como las sales de amonio cuaternario, que tienen mayor actividad a pH alcalino y ante los cuales los organismos Gram positivos son más susceptibles (Figura 1). Aniónicos: como los jabones y los ácidos grasos, que presentan mayor actividad a pH ácido y son eficaces contra los microorganismos Gram positivos. Anfóteros: que son los compuestos que actúan como catiónicos o aniónicos, según el pH.

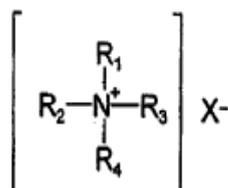


Figura 1. Estructura química de los Compuestos de Amonio Cuaternario. Tomado de:
<http://patentados.com/img/2010/04-descripcion/composicion-quimica-y-usos.1.png>

Se ha conocido a lo largo de los años que los compuestos QACs son agentes activos sobre las membranas, es decir, su sitio blanco es, predominantemente la membrana citoplasmática interna de las bacterias, o la membrana plasmática en levaduras (McDonnell y Russell, 1999). Estos compuestos, lesionan la membrana celular debido a que desorganizan la disposición de las proteínas y fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo con el metabolismo energético y el transporte activo.

Estos compuestos se han utilizado para una variedad de propósitos clínicos por ejemplo, la desinfección preoperatoria de la piel intacta, la aplicación en las membranas mucosas, y la desinfección de las superficies inanimadas. Los QAC son generalmente inodoros, incoloros, no irritantes y desodorizantes. Son desinfectantes de amplio espectro y tienen acción detergente. Los QAC se inactivan en presencia de jabones, en forma concentrada son muy estables y tienen una vida útil muy larga. Los compuestos de amonio cuaternario se absorben a nivel de los grupos cargados negativamente de las estructuras de la superficie celular. La desorganización de la membrana da lugar a la modificación de la permeabilidad y una desnaturalización de las proteínas estructurales y las enzimas. El espectro de actividad de estos productos es bastante elevado, son en general buenos bactericidas, fungicidas y algicidas; pero presentan una baja actividad frente a virus y esporas (Medina y Valencia, 2008).

Cuando los microorganismos se encuentran expuestos a ciertos agentes catiónicos, se ha propuesto la siguiente secuencia de eventos: (i) la adsorción y la penetración del agente en la pared celular, (ii) la reacción con la membrana citoplasmática (lípidos o proteínas), seguido por la desorganización de la membrana, (iii) fuga del material intracelular de bajo peso molecular (iv) la degradación de proteínas y ácidos nucleicos, y (v) la lisis de la pared causada por las enzimas autolíticas. Los agentes catiónicos reaccionan con los fosfolípidos de la membrana

citoplasmática provocando una distorsión de la membrana y la lisis de los protoplastos en condiciones de estrés osmótico (McDonnell y Russell, 1999).

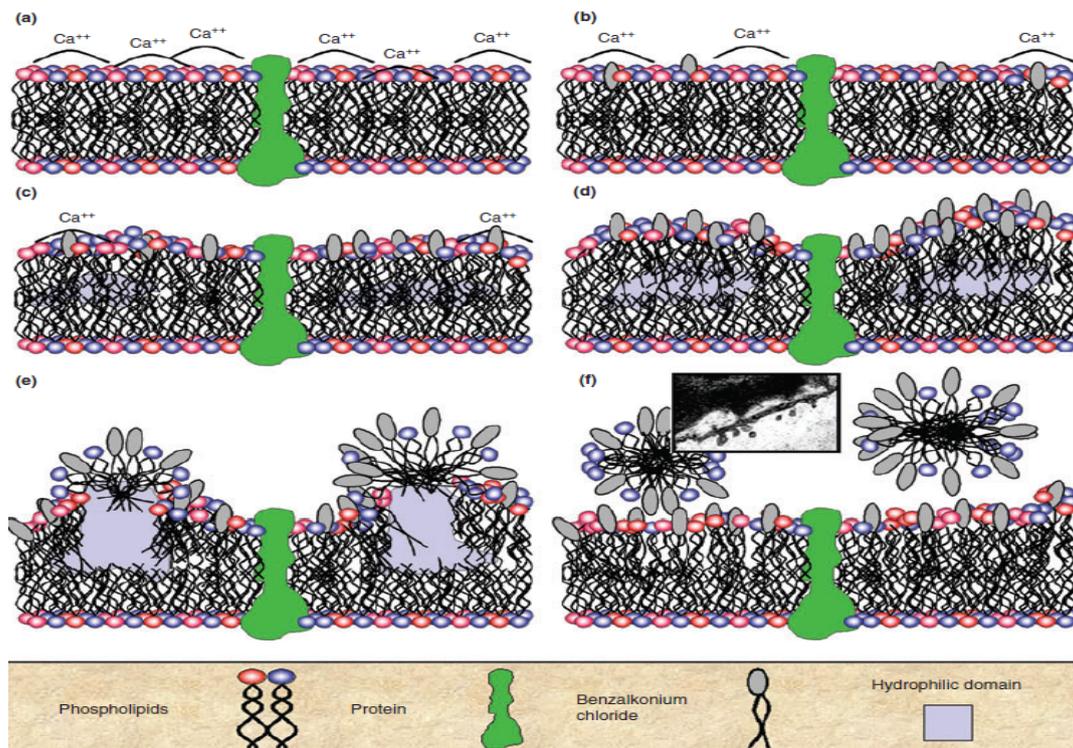


Figura 2. Representación del mecanismo de acción de compuestos de amonio cuaternario (QAC). Los segmentos (a-f) muestran la absorción progresiva de la cabeza de estos compuestos dentro de los fosfolípidos de la membrana a medida que se incrementa su concentración y tiempo de exposición. Esto conlleva a una disminución de la fluidez de la bicapa y crea vacíos hidrofílicos en la membrana (d y e). Ocurre la eventual lisis de la célula y solubilización de los fosfolípidos y proteínas dentro de las micelas QAC/ fosfolípidos (f). La micrografía muestra la formación de vesículas a partir de la membrana externa, causada por el tratamiento con QAC (tomado y modificado de Gilbert and More, 2005).

1.6 COMPUESTOS CON POLIMETILEN DIUREA

Polimetilen diurea es una base fuerte, que tiene como mecanismos de acción sobre las bacterias, al ingresar a la célula se produce la disociación iónica en iones hidroxilos, inhibiendo las enzimas de la membrana citoplasmática, produciendo una alteración química de los componentes orgánicos y del transporte de nutrientes, causando el efecto tóxico sobre la célula bacteriana. Los iones hidroxilo actúan como radicales libres altamente oxidantes, que muestran reactividad marcada e indiscriminada (McDonnell y Russel, 1999).

El efecto de este agente activo tiene sobre las bacterias se ha sugerido que sea por los siguientes mecanismos:

- Daño de la membrana citoplasmática de la bacteria.

La membrana citoplasmática posee funciones importantes para la célula como son: Transporte de solutos, transporte de electrones, excreción de enzimas y moléculas que participan en la biosíntesis de DNA y lípidos de la pared. Los iones hidroxilo inducen una peroxidación lipídica, dando como resultado la destrucción de los fosfolípidos y de los componentes estructurales de la membrana celular. Además, remueven átomos de hidrógenos de los ácidos grasos insaturados, lo que genera los radicales libres lipídicos. Estos radicales libres reaccionan con el oxígeno, dando como resultado la formación de un radical lipídico que remueve otro átomo de hidrogeno de un segundo ácido graso generando otro peróxido lipídico. Los peróxidos por sí mismos actúan como radicales libres iniciando una reacción en cadena autocatalítica, dando como resultado la pérdida de los ácidos grasos insaturados y un daño extenso en la membrana de las células bacterianas (Hugo y Russell,1999).

- Daño sobre el DNA

Los iones hidroxilo reaccionan con el DNA bacterial e inducen la separación de las cadenas. En consecuencia la replicación del DNA resulta inhibida y la actividad celular es alterada. La presencia de estos radicales, puede inducir mutaciones letales.

➤ Desnaturalización de Proteínas

El metabolismo celular depende de actividades enzimáticas óptimas a un pH neutro. La alcalinización que provee el hidróxido produce el rompimiento de las uniones iónicas que mantienen la estructura terciaria de las proteínas.

1.7 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Hay géneros de bacterias con resistencia innata a antibióticos específicos, como por ejemplo *Stenotrophomonas maltophilia* a los carbapenems. Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante la adquisición de genes de resistencia a través de varios mecanismos como:

Transducción: Transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina *transducción generalizada* y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano pero se conserva el genoma viral se habla de *transducción especializada* (Prescott, 1999).

Transformación: Transferencia de genes de un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Prescott, 1999).

Transposición: Movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes (casete) unidos en conjunto bajo la expresión de un promotor en particular (Prescott, 1999).

Conjugación: Transferencia de material genético contenido en plásmidos, de una bacteria a otra. Estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes (Prescott, 1999).

Existen diversos mecanismos de resistencia bacteriana, los cuales pueden ser utilizados más de uno a la vez por las bacterias:

1. **Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -Lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.

2. **Bombas de expulsión:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Livermore, 1991).

3. **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica y la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente,

por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Cavaco y col., 2008)

4. Alteraciones del sitio de acción: las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilina (Vila y col., 2007).

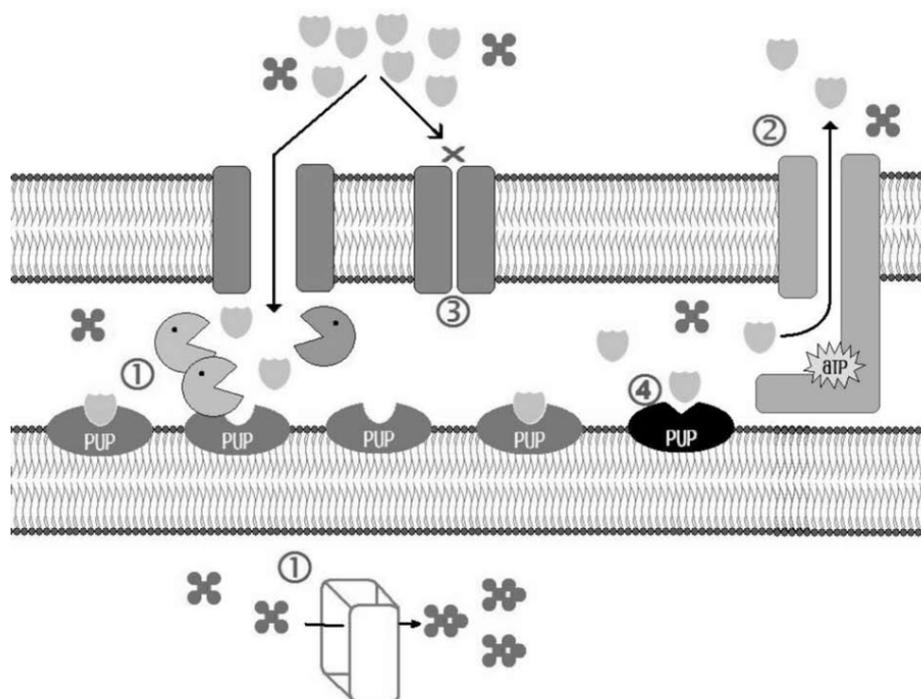


Figura 3. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidoras de penicilinas. Proteínas de Unión a Penicilina (PUP). Tomado y modificado de: Tafur y col., 2008

1.8 *Stenotrophomonas maltophilia*.

Stenotrophomonas maltophilia, bacteria perteneciente al género *Stenotrophomonas*, especie *maltophilia*, anteriormente conocida como *Xanthomonas maltophilia* y *Pseudomonas maltophilia*, es un bacilo Gram negativo, no fermentador de glucosa, oxidasa negativo, no esporulado, móvil, aerobio estricto, que se desarrolla en forma rápida en los medios de cultivo utilizados de rutina. Las colonias son rugosas y de color blanco a amarillento en MacConkey y café verdoso en agar sangre, generalmente no son hemolíticas y tienen un olor característico a amoníaco. Oxida la maltosa más rápido que la glucosa, hidroliza la esculina y descarboxila la lisina. Además, es DNAsa y gelatinasa positivo e hidroliza el almidón, es urea negativo y crece perfectamente en agar MacConkey. Entre las pruebas bioquímicas positivas (más del 85% de los casos) destacan: síntesis de ornitina descarboxilasa, hidrólisis de la esculina, de la gelatina y del Tween 80. Pese a no ser muy activa metabólicamente, *S. maltophilia* puede metabolizar algunos sustratos inusuales como la estreptomina, por lo que ha sido investigada como potencial agente biodegradante. Ha sido reconocido como agente causal de diversas infecciones nosocomiales. Se ha reportado que presenta resistencia a múltiples agentes antimicrobianos. *S. maltophilia* es un patógeno nosocomial oportunista, perteneciente a la familia *Xantomonadaceae*, el cual ha sido aislado de muestras provenientes de humanos, animales, alimentos y varias fuentes ambientales (Anton y col., 2005).

Esta bacteria presenta una longitud entre 0.5 a 1.5 micras, generalmente se encuentra sola o en pares, presenta motilidad por medio de flagelos localizados en sus polos. En los medios de cultivo sólidos las colonias son lisas, con un color que puede variar de blanco a ligeramente amarillo (Figura 4, figura 5). Es un organismo aerobio obligado, que no crece a una temperatura inferior a 5 °C, y ni a una temperatura superior de 40 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento 35 °C (Gutiérrez y col., 2007)



Figura 4. *Stenotrophomonas maltophilia*. Colonia amarilla verdoso en MacConkey. Tomado y modificado de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000300009&script=sci_arttext.

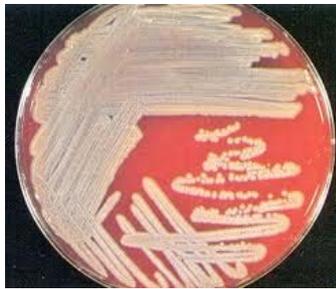


Figura 5. *Stenotrophomonas maltophilia* en medio agar sangre. (Tomado y modificado de <http://www.gefor.4t.com/bacteriologia/stenotrophomonasmaltophilia.html>).

Aunque por años fue considerada como una bacteria de patogenicidad limitada, en años recientes, los nuevos reportes indican que las infecciones asociadas a esta bacteria se relacionan con aumento en la morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, con estancia prolongada en el hospital y que han recibido antimicrobianos de amplio espectro (Gutiérrez y col., 2007).

Una propiedad que posee esta bacteria es la de unirse ávidamente a la superficie de implementos médicos, como lo son ventiladores mecánicos y catéteres endovasculares. Esta propiedad de adherirse a objetos inanimados, es conferida por medio de fimbrias, lo que le permite

formar un "biofilm" o biopelícula, que le concede algún tipo de inmunidad natural contra los medios de defensa del hospedero y contra los agentes antimicrobianos (Gutiérrez y col., 2007).

Esta bacteria presenta una gran diversidad genómica. Las infecciones provocadas por *S. maltophilia* representan un gran problema de Salud Pública debido a su multirresistencia. Esta resistencia a los antimicrobianos está asociada fundamentalmente a la presencia de bombas de eflujo, que impiden que se alcancen concentraciones altas de antimicrobianos en el interior de la bacteria, además de la producción de enzimas betalactamasas (L1 y L2), que hacen que los antibióticos betalactámicos y carbapenems carezcan de actividad (Anton y col., 2007). En estas bacterias, la resistencia a quinolonas es mediada primordialmente por la sobreexpresión de bombas de eflujo y los bajos niveles de permeabilidad a la membrana (Anton y col., 2007).

Esta característica de multirresistencia involucra una disminución de la permeabilidad de la membrana que impide la entrada del antibiótico, por lo que hay falta de un sistema de transporte para ese antibiótico, en combinación con la producción de enzimas hidrolíticas o inactivantes, y sistema de bombeo activo del antibiótico hacia el exterior de la bacteria.

También se han descrito algunas cepas de *S. maltophilia* que poseen enzimas modificantes de los aminoglucósidos como acetil o O-nucleotidiltransferasas, entre ellas la AAC(6)Iz, que inactiva tobramicina y amikacina, que se ha encontrado en un elevado número de cepas de *S. maltophilia*. Sin embargo, el principal mecanismo de resistencia que explica la baja actividad de este tipo de antibióticos frente a *S. maltophilia* es la disminución en la acumulación de aminoglucósidos en el interior de la bacteria. Esto puede ser debido a cambios en proteínas de membrana externa o a nivel de lipopolisacárido (López, 2008).

Diversos mecanismos le confieren resistencia de alto grado frente a los Betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera generación y carbapenems, aminoglucósidos, macrólidos y, de forma variable, a las quinolonas. Igualmente, no son bien conocidos los mecanismos de virulencia de *Stenotrophomonas maltophilia* y tampoco se conoce a profundidad su modo de adquisición, si bien se asume que la hospitalización y la antibioticoterapia de amplio espectro son los factores de riesgo más relevantes para la adquisición de este microorganismo, que también suele afectar a pacientes debilitados.

2. ANTECEDENTES

En el siglo XX, el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos. La implicación higiénico-sanitaria y epidemiológica que acarrea la existencia de bacterias patógenas multiresistentes en el medio hospitalario, tiene gran significación si consideramos que la circulación de estos microorganismos constituye un peligro potencial para la salud, pudiendo ser efectivo el uso de desinfectantes y antisépticos para su control adecuado (Cabrera y col., 2007).

La resistencia bacteriana a los biocidas fue descrita en las décadas de 1950 y 1960 y ha ido en aumento. Ciertos biocidas como alcoholes, formaldehídos, biguanidas, yodóforos, aldehídos y agentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternario (QACs), la clorhexidina y el triclosán, se han comprometido como posibles causantes de la selección y persistencia de cepas bacterianas con bajo nivel de resistencia a los antibióticos. El uso generalizado de los antisépticos y los desinfectantes genera expectativas sobre la resistencia bacteriana provocada por la presión ambiental que ejercen los productos ya mencionados, y enfoca el interés hacia la posible resistencia cruzada con los antibióticos.

2.1 Antecedentes Internacionales

Los graves problemas en los Centros de Salud asociados a la resistencia bacteriana a los antibióticos se han agravado por el uso extendido y sin control de los productos desinfectantes, ya que los microorganismos también han sido capaces de adquirir resistencia para evadir su acción, reportándose la presencia de aislados bacterianos de origen hospitalario que presentan una resistencia cruzada a la acción de los desinfectantes y los antibióticos. Existen muchos reportes a

nivel mundial sobre el aislamiento de bacterias con mecanismos que les permiten sobrevivir al efecto de los agentes desinfectantes. A continuación se describen algunos de estos trabajos.

Chopra evaluó el papel de los plásmidos en la resistencia codificada en estas moléculas con incremento en la tolerancia a los antisépticos y los desinfectantes y concluyó que aparte de ciertos ejemplos específicos, como algunos metales, los plásmidos no eran los responsables por los altos niveles de resistencia a antisépticos o desinfectantes de ciertas especies o cepas (Chopra, 1987).

Sutton y Jacoby, reportaron que el plásmido RP1 no alteraba en forma significativa la resistencia de *P. aeruginosa* a QAC, clorhexidina, yodo o fenoles clorados, aunque se observó un aumento en la resistencia a hexaclorofeno. La movilización por transformación de este plásmido (que codifica resistencia a carbenicilina, tetraciclina, neomicina y kanamicina) en *E. coli* ó *P. aeruginosa*, no aumentó ni la sensibilidad ni la resistencia de estas bacterias a los antisépticos y desinfectantes. Se han reportado altos niveles de resistencia en aislados bacterianos de hospitales, aunque no es claro que haya una resistencia mediada por el plásmido, y los autores concluyen que los altos niveles de tolerancia a clorhexidina y QAC, pueden ser intrínsecos o se pueden haber generado por mutaciones (Sutton y Jacoby, 1978). Sin embargo, en años posteriores algunos autores evidencian la relación entre la presencia de plásmidos en bacterias con el aumento de la tolerancia a clorhexidina, QAC, triclosán, así como a diamidinas (Russell, 1997).

En el año 2000, fue realizado un estudio por Guimarães y colaboradores, para evaluar la actividad bactericida de algunos desinfectantes contra aislados bacterianos tanto susceptibles, como resistentes a antibióticos, de un hospital de Brasil. Los autores reportaron que todas las cepas fueron susceptibles a hipoclorito de sodio, glutaraldehído y compuestos de amonio cuaternario. La susceptibilidad de las cepas que se trataron con fenol y con un compuesto de amonio cuaternario

era variable. Entre los veintiún aislados multirresistentes a los antibióticos, once fueron resistentes a los compuestos de amonio cuaternario y ocho al fenol. Los resultados demostraron la falta de correlación entre la susceptibilidad a los antibióticos y la susceptibilidad a los desinfectantes en las cepas hospitalarias analizadas (Guimares y col., 2000).

En el año 2000, Rutala, evaluó la eficacia de productos naturales como el vinagre, bicarbonato de sodio y desinfectantes comerciales comunes (Vesphene IISE, TBQ, Clorox, Lysol spray desinfectante, Lysol Limpiador para la cocina antibacteriano, el Sr. Ultra Clean, etanol), diseñados para el hogar o uso institucional, frente a los posibles agentes patógenos humanos, entre los que se incluyeron bacterias resistentes a antibióticos, realizando una prueba de suspensión cuantitativa para evaluar la eficacia de los desinfectantes seleccionados después de tiempos de exposición de 30 segundos y 5 minutos. Las bacterias evaluadas en este estudio fueron: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* O157: H7, y *Pseudomonas aeruginosa*. Los desinfectantes elegidos también se ensayaron contra el virus de la polio, a especies de *Enterococcus*, y *S. aerus*. Como resultados obtuvieron que algunos compuestos demostraron una excelente actividad antimicrobiana en los tiempos utilizados y una variedad de desinfectantes de casas comerciales fueron eficaces contra las bacterias evaluadas. Los productos naturales, son menos eficaces que los desinfectantes de las casas comerciales. Sólo Clorox y el desinfectante Lysol fueron eficaces contra poliovirus (Rutala, 2000).

En el año 2003, Tuncay y colaboradores, evaluaron el efecto bactericida de algunos antisépticos y desinfectantes utilizados en varios hospitales contra bacterias Gram negativa, tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Enterobacter*. El ensayo cuantitativo de suspensión fue utilizado para medir la eficacia antimicrobiana de agentes, tales como, la clorhexidina y Savlon. En este estudio, se encontró que el gluconato de clorhexidina (4%)

y Savlon (1:100) fueron eficaces contra todas las cepas de bacterias a los 5 minutos de exposición (Tuncay y col., 2003).

En el año 2006, fue realizado un estudio por Nuñez y Morretton, en el que se evaluó la flora microbiana de un efluente hospitalario y el perfil de resistencia de la población bacteriana a distintos desinfectantes. Los desinfectantes evaluados en este estudio son los más utilizados en el centro de salud como lo son el glutaraldehído, iodo povidona, y clorhexidina. En la población bacteriana de las muestras analizadas entre un 2.0 y un 4.3 % resultaron ser resistentes a la clorhexidina. La resistencia a los demás desinfectantes se observó en aproximadamente el 0.02 % de la población bacteriana del efluente. Las bacterias resistentes fueron identificadas y se evaluó su nivel de resistencia y fueron identificadas como especies de los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus*, microorganismos que en muchos casos son agentes de infecciones intrahospitalarias (Nuñez y Morretton, 2006).

Se ha demostrado que los desinfectantes y los antisépticos no son selectivos y tienen un espectro continuo e inespecífico de actividad, y aunque existe un manual de uso de los mismos; en muchos hospitales no se aplica como es debido. Por esta razón, Rodríguez y colaboradores se propusieron realizar un estudio en el año 2006, para determinar la sensibilidad y la resistencia de cepas bacterianas causantes de infección nosocomial en tres hospitales de Ciudad de La Habana, frente a seis soluciones desinfectantes y antisépticas en uso. Las soluciones utilizadas para enfrentar a las 137 cepas fueron: Formulación de formalina alcohólica, Hibitane acuoso al 2% w/v, Ácido acético al 2% v/v, Hibitane alcohólico al 0.5% w/v, Alcohol etílico al 86% v/v, Formulación de alcohol yodado. Los autores reportan que no hubo diferencias significativas entre los tres hospitales evaluados (Rodríguez y col., 2006).

Se han hecho estudios en los cuales se midieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) que presentan tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas, y se estableció que hay diferencias marcadas entre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* frente a los compuestos de amonio cuaternario (QAC), hexaclorofeno, diamidinas y triclosán, pero poca diferencia en la susceptibilidad a la clorhexidina. *Pseudomonas aeruginosa* es más resistente a la mayoría de estos agentes, incluyendo la clorhexidina (Gilbert y McBain, 2003).

Un estudio reciente realizado, por Bataillon y colaboradores, evaluó las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de antibióticos y alkyldimethylbenzylammonium cloruro (ADBAC) y cloruro de didecildimetilamonio (DDAC), por el método de dilución en agar, a 153 cepas aisladas de pacientes con *Escherichia coli* del Hospital Clínico Universitario de Rennes, ubicado en Francia. Los resultados de este estudio demuestran una relación epidemiológica en los aislados clínicos de *Escherichia coli* entre los valores de MIC para QACs y la resistencia a los antibióticos (Bataillon y col., 2011).

2.2 Antecedentes Nacionales

En nuestro país, como en el resto de América Latina y el mundo, ocurren problemas de resistencia microbiana. A pesar de esto, los estudios que se han realizado en el ámbito nacional, tradicionalmente se han basado en la caracterización de los determinantes de resistencia a los distintos antibióticos presentes en los aislados bacterianos. Sin embargo son escasos los reportes sobre el perfil de resistencia contra los biocidas de uso común en los ambientes hospitalarios.

En Venezuela, la resistencia a los biocidas ha sido un tema muy poco explorado y en particular existen muy pocos estudios en los que se haya evaluado la resistencia a compuestos de amonio

cuaternario, como el Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio, a pesar que este compuesto es el agente activo de la mayoría de los desinfectantes que son utilizados en nuestros hospitales. A nivel clínico, en el año 2006, debido a la aparición en Caracas de varios brotes de infecciones por micobacterias atípicas en tejido blando y piel tras procedimientos estéticos como la liposucción, lipoescultura, y mesoterapia que involucraron de 5 hasta 15 personas, Bello y colaboradores, se dedicaron a evaluar la actividad sobre las micobacterias; por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa de la Comunidad Europea; de varios desinfectantes de producción nacional y que son usados comúnmente en Venezuela en los hospitales y los consultorios para la desinfección de materiales críticos y semicríticos y están registrados como productos esterilizantes y/o tuberculicidas. Los desinfectantes evaluados en el estudio fueron, Bromuro de Lauril Dimetil Bencil amonio, en concentraciones de 10 y 0,16%, 5% Polimetilen diurea, 2% glutaraldehído y 0,55% orthophthaldialdehído. La actividad micobactericida se evaluó con las cepas de referencia *Mycobacterium smegmatis* ATCC 19420, *M. tuberculosis* H37Rv. y cepas de *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus* aisladas de muestras clínicas. Los autores reportan que los desinfectantes que presentan como agente activo el 2% glutaraldehído y 0,55% orthophthaldialdehído, fueron efectivos frente a todas las micobacterias evaluadas bajo condiciones utilizadas en este estudio. Para los desinfectantes con agente activo bromuro de lauril dimetil bencil amonio, en concentraciones de 10 y 0,16% se demostró una actividad micobactericida y tuberculicida inadecuada, cuando la actividad es evaluada según las normas europeas (Bello y col., 2005).

En el 2011, Ramos y Alonso, del Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental, reportaron la caracterización fenotípica de los determinantes de resistencia a agentes desinfectantes (cuyos agentes activos son QACs), presentes en cepas bacterianas multiresistentes a los antibióticos de uso frecuente, aisladas de ambientes naturales acuáticos venezolanos.

Utilizaron la prueba de rapidez de muerte celular para evaluar la resistencia a los desinfectantes de aislados ambientales y clínicos, y ensayos de conjugación bacteriana para corroborar la posible asociación de los determinantes de resistencia a moléculas plasmídicas. Los autores encontraron que, de los microorganismos evaluados, los *Gram*-negativos, como *E. coli*, resultaron ser los más sensibles, mientras que las cepas ambientales presentaron mayores niveles de resistencia en comparación con las hospitalarias. Se obtuvieron transconjugantes con niveles de resistencia semejantes a la cepa donante, sugiriendo que en estos aislados los determinantes de resistencia a los desinfectantes están codificados en plásmidos, los cuales se analizaron por su patrón de restricción (Ramos y Alonso, 2011).

Igualmente en este mismo Laboratorio fueron aisladas bacterias del Servicio de Neonatología y de la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Universitario de Caracas. Estos aislamientos se identificaron como 15 cepas pertenecientes al género *Stenotrophomonas*, de la especie *maltoiphilia*, de estas cepas, 7 eran provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales, 1 aislada del ambiente del Servicio de Neonatología y 7 del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva. Estos aislados bacterianos no han sido estudiados en relación a su capacidad de resistencia a diversos agentes desinfectantes, que sin lugar a dudas arrojarán resultados muy importantes para estos organismos que poseen un amplio espectro de resistencia a los antibióticos, y el uso efectivo de desinfectantes contribuiría al control sanitario (Chalbaud y Alonso, 2008).

Debido a las propiedades antimicrobianas que poseen estos compuestos, su bajo costo y fácil adquisición, existe la tendencia mundial al aumento en el uso de estos agentes, incorporándolos en las medidas de control contra las infecciones de origen bacteriano, además de su uso cotidiano y habitual, lo cual ha conllevado a la selección de cepas bacterianas resistentes. Este problema se puede tornar especialmente crítico en la flora bacteriana residente de los Centros de Salud. Entre

los microorganismos asociados a infecciones se encuentra *S. maltophilia*, bacilo ubicuo, pues se encuentra en el suelo, el agua, los vegetales y los animales, y cuya incidencia de aparición nosocomial se está viendo incrementada. En el medio hospitalario se aísla en el agua procedente de respiraderos, grifos y sumideros, en desinfectantes, jabones, descontaminantes preoperatorios, tubos con EDTA, reservorios de humidificadores de oxigenoterapia, catéteres de succión traqueal y bombas auxiliares cardiopulmonares, y en ocasiones en las manos del personal sanitario. Aparte de los estudios mencionados, existe muy poco conocimiento sobre el fenotipo de resistencia bacteriana a los antisépticos y los desinfectantes de uso común en nuestro país. En este estudio nos proponemos evaluar la capacidad de resistencia de aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* (Chalbaud y Alonso, 2008), a la acción de desinfectantes comúnmente utilizados en ambientes hospitalarios, con el fin de aportar información que contribuya a la búsqueda de una solución para este problema, ya que *Stenotrophomonas maltophilia* es uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales.

3. JUSTIFICACIÓN

La limpieza y la desinfección, constituyen, junto la esterilización, los elementos primarios y más eficaces para romper o al menos controlar, la cadena epidemiológica de la infección. La infección hospitalaria constituye un tema de extraordinaria actualidad por su frecuencia, gravedad y repercusión económica. En los centros de salud es donde se hace más necesario el uso de los desinfectantes, por esta razón, es necesario que este impida de forma eficaz y viable la contaminación microbiana y mantenga limpia las superficies y los equipos de trabajo.

La atención hospitalaria requiere de las máximas exigencias de higiene, ya que los instrumentos médicos, la mala higiene de los mismos y en muchos casos la del personal que ahí trabaja, son la causa de muchas infecciones intrahospitalarias; además del prolongado período de hospitalización, el uso indiscriminado de los antibióticos y la demora en la recuperación de los pacientes, resulta evidente que la prevalencia y control de las infecciones intrahospitalarias constituyen una prioridad en la salud pública.

La aparición de la resistencia bacteriana conlleva al fracaso de tratamientos, y por ende al uso de antibióticos cada vez más potentes, y además al aumento de consumo de los mismos buscando sinergismo o diferentes mecanismos de acción, provocando una continua competencia entre los microorganismos resistentes que infectan al hombre y los antibióticos comúnmente usados.

Además, en Venezuela, son pocos los estudios reportados sobre la resistencia bacteriana a los antisépticos y desinfectantes de uso común en centros de salud de nuestro país, es por ello que en este estudio nos propusimos evaluar la capacidad de resistencia a los desinfectantes en aislados de origen hospitalario, en este caso *S. maltophilia*

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Evaluar la capacidad de resistencia de aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* a la acción de diversos desinfectantes comúnmente utilizados en ambientes hospitalarios.

4.2. Objetivos Específicos.

- Determinar los fenotipos de resistencia a diferentes agentes desinfectantes en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*.
- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los agentes desinfectantes en las cepas *Stenotrophomonas maltophilia* que resultaran resistentes.
- Comparar la capacidad de resistencia al efecto de los desinfectantes en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* que sean susceptibles o resistentes a antibióticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico.

Con el fin de determinar la resistencia a los desinfectantes que presentan como agente activo el Bromuro Lauril Dimetil Bencil Amonio, se evaluaron dos productos comerciales uno que contiene el agente activo QAC en una concentración del 10% y otro producto que presenta como agente activo el polimetilen diurea 5% en el otro producto y está libre de Compuestos de Amonio Cuaternario.

Los microorganismos utilizados fueron aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*, obtenidos tanto de ambientes inanimados como de pacientes hospitalizados en el Hospital Clínico Universitario de Caracas, identificadas en trabajos previos del laboratorio.

En la tabla 5, se señalan los diferentes aislados bacterianos que serán utilizados.

Tabla 5. *Stenotrophomonas maltophilia* aisladas del Hospital Clínico Universitario.

AISLADOS	ESPECIE BACTERIANA
SU1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SU7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SN1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SB7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

SB= Aisladas de Pacientes. SU= Aisladas del área inanimada de Terapia Intensiva SN: Aislado del servicio de Neonatología HUC

En la tabla 5, se describen los aislados que se utilizaron para la evaluación de la resistencia a los desinfectantes, los cuales fueron aislados en el período abril 2007 a marzo 2008, realizándose 1 toma cada 2 meses (Chalbaud, 2008). Los aislados denominados SB fueron obtenidos de pacientes, y los denominados SU fueron provenientes del área inanimada de Terapia Intensiva, ambas provenientes del Hospital Clínico Universitario de Caracas. El aislado SN1 es proveniente de un muestreo en superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Neonatología del Hospital Clínico Universitario. La cepa *Escherichia coli* J62-2 es el control negativo de este estudio, ya que es sensible a los desinfectantes que se evaluaron en este ensayo, depositada del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM # 131). El aislado SB2, fue utilizado como control positivo, ya que estudios previos han indicado que es resistente al Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%

Estos aislados utilizados fueron escogidos de las áreas de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y del servicio de Neonatología (SN). La primera se encuentra en el piso 6, ala A, en la que se alberga a 12 pacientes en un área común y además posee un área de lavado, faena, drogas y sala de reuniones. El área de Neonatología se encuentra en el piso 10, ala C del HUC, la cual incluye la Unidad de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), que alberga de cuatro a seis pacientes, la Unidad de Cuidados Intermedios Neonatales (UCIN) en la que se encuentran entre diez y catorce pacientes, el retén, áreas de lavado, faena, oficinas, salas de conferencias y descanso de personal (Figura 6).

En la figura 6, se muestra las áreas Tanto de Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y el Servicio de Neonatología (SN) de las cuales fueron recolectados los aislados bacterianos de *Stenotrophomonas maltophilia*.



Figura 6. Áreas de las cuales fueron recolectadas las muestras. (Tomado y modificado de: Chaulbaud, 2010)

Las zonas en las que se realizó la recolección de estas muestras fueron: superficies inanimadas, manos del personal y cualquier otro punto que se consideró necesario al momento de la recolección de muestras. La escogencia de los lugares específicos de cada servicio, de las cuales fueron escogidas las muestras, se realizó de manera aleatoria, considerando la dinámica de cada zona de estudio.

5.2 SOLUCIONES

Las soluciones que se utilizaron para la realización de este trabajo se prepararon con reactivos Grado Biología Molecular, adquiridos en diversas casa comerciales como Sigma y Promega. El agua destilada, material de vidrio y material desechable fue esterilizado en autoclave por 15 min a 120 °C a 15 lbs de presión. Antes de cada procedimiento, se esterilizó el ambiente de trabajo, con soluciones como alcohol y cloro al 100%.

Caldo Luria-Bertani (LB)

Este medio líquido contiene por litro de agua destilada: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 5g de cloruro de sodio (Coello y col., 2003).

Agar Luria-Bertani (LB).

Este medio sólido contiene por litro de agua destilada: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, y 15 g de agar (Coello y col., 2003). Luego de preparada, la solución se esterilizó en una autoclave a 15 atm de presión a 121°C por 15min.

Caldo Lethen Modificado

Se realizó el cultivo de bacterias en caldo Lethen modificado, con una composición de 5 g extracto de carne, 10 g de peptona de carne, 2 g de extracto de levadura, 0,1 g. de bisulfato de sodio, 0,7 g lecitina de soya, 5 g de cloruro de sodio, en un litro de agua destilada y 5 mL de polisorbato 80 (Twen 80). Los componentes se llevarán a disolución completa por ebullición. Posteriormente se equilibra a pH y se esteriliza en autoclave a 15 lb y 120 °C por 15 min.

Para la prueba de rapidez de muerte celular y suspensión cuantitativa, los caldos con los que se trabajó fueron preparados el día anterior, debido a que no pueden tener más de 24 horas de crecimiento bacteriano en cultivo.

Agar MacConkey

Este medio sólido contiene por 1 litro de agua destilada 51,5 g de agar MacConkey, de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial.

Desinfectantes

Se utilizaron dos desinfectantes de uso común en Venezuela, uno que presenta como agente activo el Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% y el otro producto comercial que contiene como agente activo el Polimetilen diurea al 5 %.

5.3 CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS EN PRESENCIA DE LOS AGENTES DESINFECTANTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES

5.3.1 Prueba de Rapidez de Muerte Celular

El principio básico de este método es que una suspensión de un germen es expuesto a la acción de un desinfectante en un tiempo específico. Luego de un periodo de incubación, se observó si los aislados bacterianos que fueron evaluados, fueron capaces de crecer bajo el efecto del desinfectante en un tiempo de exposición determinado. Esta prueba es netamente cualitativa.

La prueba de Rapidez de Muerte Celular se realizó con bacterias que se encontraban tanto en fase de crecimiento en estado estacionario (24 horas), como en fase de crecimiento en estado exponencial (2 horas).

De una colonia previamente aislada, se procedió a inocular con una asa estéril, cada aislado de estudio, mencionado en la tabla 5, en 2 mL de medio líquido Luria Bertani (LB), durante toda la noche a 37°C, transcurrido este tiempo y observando el crecimiento de cada aislado, se tomó una alícuota para procesar (Fase Estacionaria), y también se realizó una dilución 1/20 de los cultivos antes mencionados, es decir, se tomaron 100 µL de cada cultivo, en 2 mL de LB y se

colocó en agitación a 37 °C, durante un tiempo 2 horas (Fase Exponencial). Ambos cultivos fueron colocados en contacto con cada uno de los desinfectantes a las diferentes concentraciones de los mismos. En un tubo eppendorf que contenía 900µL de cada dilución de los productos desinfectantes se le adicionó 100 µL de cada aislado bacteriano mostrado en la Tabla 4, y se permitió un tiempo de exposición de 2 min. Una alícuota de 100 µL de esta mezcla se colocó en contacto con 900 µL del neutralizante, que permitirá finalizar el efecto del desinfectante, y se incubaron por 24 horas en agitación a 37 °C, para finalmente observar el crecimiento bacteriano. Las concentraciones ensayadas para este compuesto fueron con el desinfectante sin diluir y sin desinfectante (Figura 7).

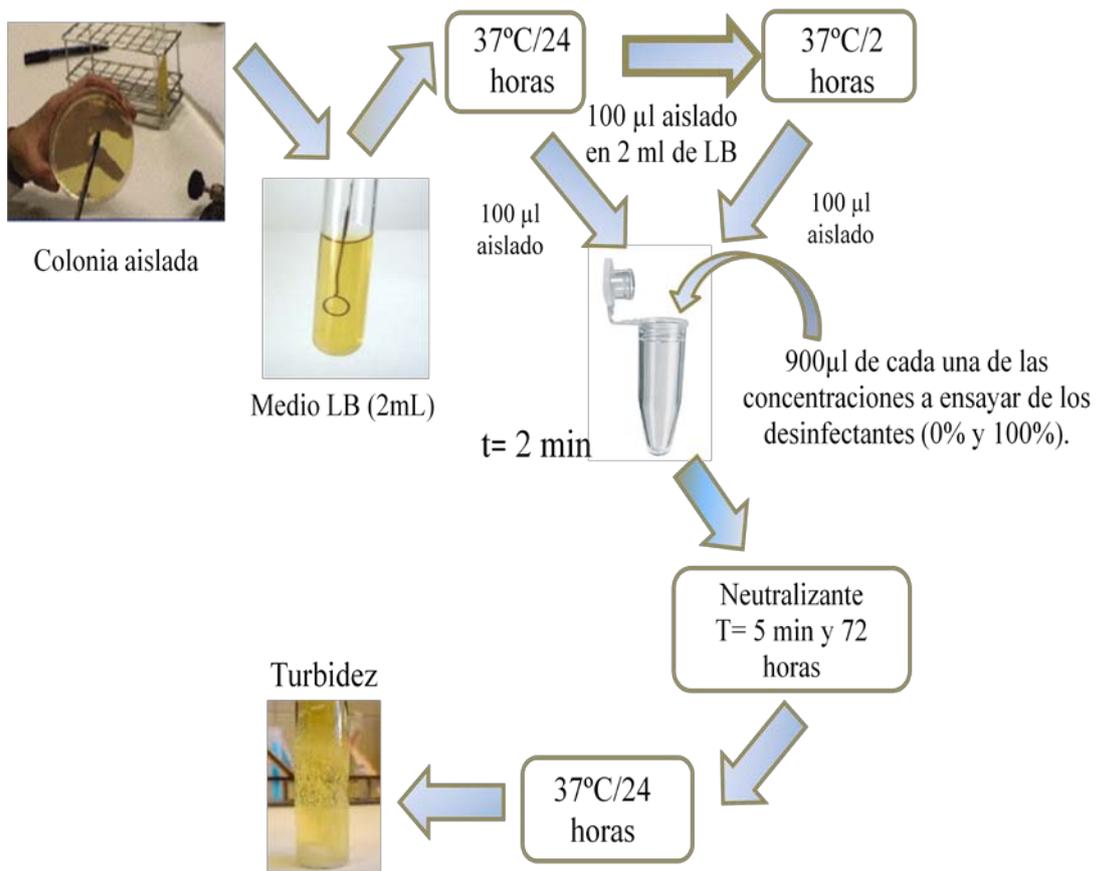


Figura 7. Protocolo seguido para la determinación de la resistencia de los aislados bacterianos por medio de la Prueba de Rapidez de Muerte Celular

5.3.2 Prueba de Suspensión Cuantitativa.

Con el fin de evaluar la capacidad de resistencia presente en los aislados clínicos de *S. maltophilia*, se realizó el crecimiento de los cultivos en presencia de los dos agentes desinfectantes ensayados: Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% y el Polimetilen diurea al 5%, siguiendo la Prueba de Suspensión Cuantitativa recomendada por la Association of Official Analytical Chemists (Anonymous, 1997).

El principio básico de este método es que una suspensión de un germen es expuesto a la acción de un desinfectante en un tiempo específico, para luego ser sembrado en medio sólido, y contar el número de células sobrevivientes.

A partir de una colonia previamente aislada, se procedió a inocular con una asa estéril, cada aislado de estudio, en 2 mL de medio líquido LB, durante toda la noche a 37°C, guardando una alícuota. Se realizó una dilución 1/20 de los cultivos diluyendo 100 µL en 2 mL de LB, y se colocó en agitación a 37 °C, durante un tiempo 2 horas. Luego de transcurridas las 2 horas, se procedió a colocarlos en contacto con cada las diluciones de los desinfectantes mezclando en un tubo eppendorf 900µL de las diferentes concentraciones de desinfectantes con 100 µL de cada aislado mencionado en la tabla 5, por un tiempo de exposición de 2 minutos. Se tomó una alícuota de 100 µL de los aislados que estuvieron en contacto con el desinfectante y se colocaron con 900 µL del neutralizante, por 5 min, y se sembraron en placas de agar LB diluciones seriadas hasta 10⁻⁸. Este procedimiento se realizó para los aislados provenientes de crecimiento de toda la noche (Estado Estacionario) y aislados en crecimiento de 2 horas aproximadamente (Estado Exponencial) (Anonymous, 1997) (Figura 8).

Con el fin de corroborar si la solución utilizada como neutralizante es efectiva en la inhibición del compuesto activo del desinfectante se realizó un control de neutralización, tomando 100 μL de una suspensión bacteriana sensible al efecto de agente, y mezclándolos con 900 μL de solución desinfectante, tomando 100 μL de esta mezcla e incubar con 900 μL del neutralizante y se siembran en placas.

Para determinar si el neutralizante utilizado no afecta la viabilidad de las bacterias se realizó un control de toxicidad, mezclando 100 μL de la suspensión bacteriana con 900 μL del neutralizante por 5 min, luego se procedió a sembrar en placas por rastrilleo 30 μL de esta mezcla y se incubó a 37°C por 24 horas

Neutralizante: es recomendado según los métodos oficiales de análisis químicos para análisis de desinfectantes catiónicos. En el medio de cultivo la peptona, el extracto de carne y la lecitina de soya, aportan los nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento bacteriano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Este medio de cultivo tiene la capacidad de neutralizar los desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soya que además de aportar nutrientes al medio de cultivo, actúa como agente emulsificante y neutraliza los compuestos cuaternarios de amonio.

En la figura 8, se muestra el protocolo que se siguió al evaluar la Prueba de Suspensión Cuantitativa, en la determinación de resistencia bacteriana a los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*.

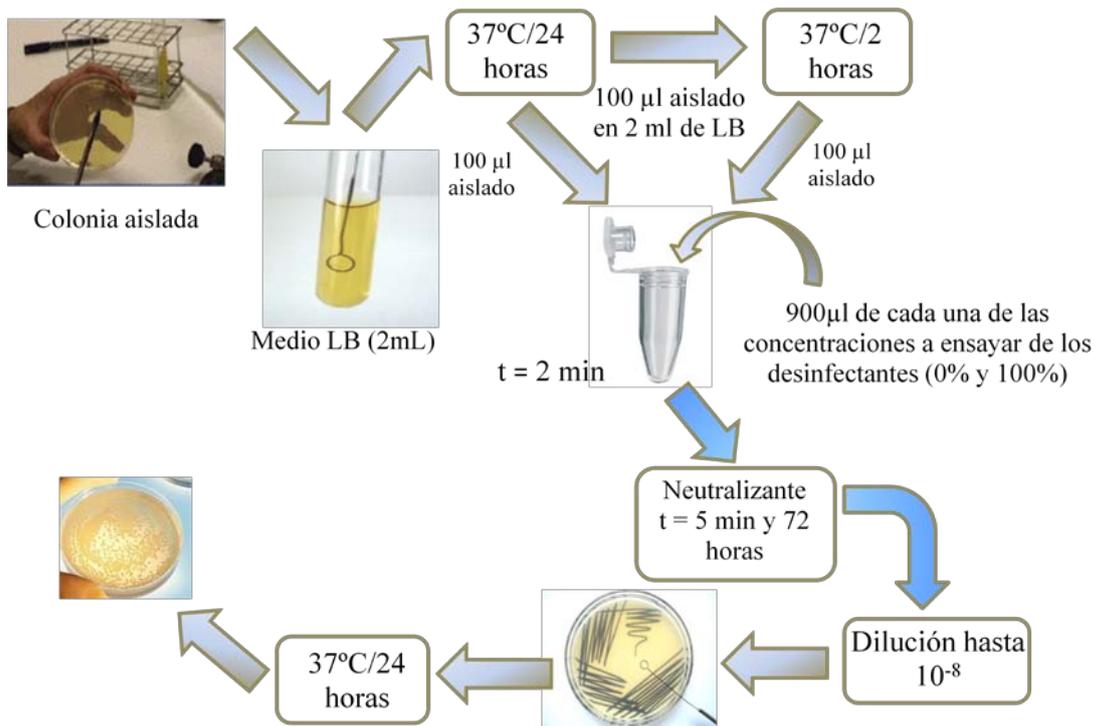


Figura 8. Protocolo a seguir para la determinación de la susceptibilidad o resistencia de las cepas por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa.

5.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Con esta prueba se determinó la mínima concentración de los agentes ensayados que es capaz de inactivar o inhibir el crecimiento bacteriano. Para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias, se trabajó con los aislados bacterianos que resultaron resistentes al desinfectante, utilizando la Prueba de la Dilución Seriada en placas de Agar-LB, suplementadas con concentraciones variables y conocidas del desinfectante, las cuales se inocularon con 100 µL de un cultivo de cada microorganismo crecido toda la noche y a las 2 horas, es decir en las 2 fases de crecimiento, e incubando a 37 °C durante 18 horas (Figura 9). Como control por cada placa del desinfectante, se inocularon también placas sin desinfectante y placas con el producto sin diluir (Andrews, 2001).

Las concentraciones que se ensayaron en esta prueba fueron de: 0%, 5%, 10%, 20%, 50% y 100%.

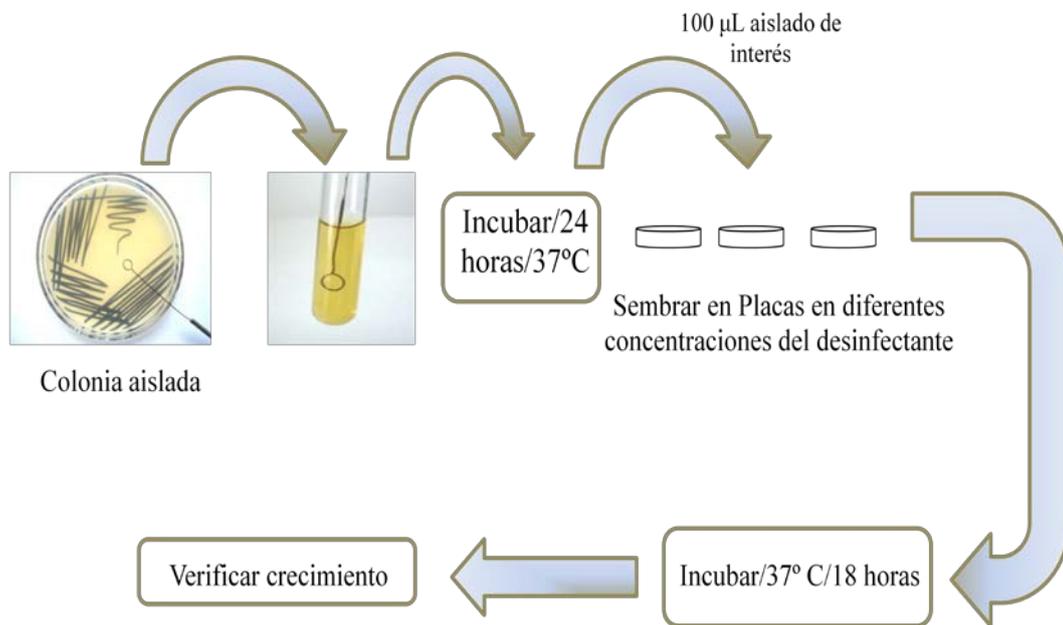


Figura 9. Protocolo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados evaluados en este estudio.

5.5. Realización de Antibiogramas

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cada uno de los aislados a estudiar se realizó mediante el método de difusión de disco (Bauer y col., 1966), siguiendo los lineamientos propuestos por CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), en este caso para ser aplicado a *S. maltophilia*. Este método se basa, en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento, que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antibiótico presente en el disco. Para esto se preparó un inóculo de cada cepa en 4,5 ml de solución salina fisiológica al 0,85% a 0,5 en escala turbidimétrica de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), a partir de cada cepa crecida 20 – 24 horas en agar LB. Posteriormente se procedió a impregnar un hisopo estéril, con

dicha solución y se diseminó sobre una placa de agar Mueller Hinton (Oxoid), luego de lo cual, se colocaron los discos de los antibióticos a analizar y se incubó por 24 h a 37 ° C.

Para la interpretación de los halos de inhibición observados para cada antimicrobiano se siguieron los valores de referencias señalados en las tablas de CLSI. El procedimiento que se llevó a cabo en este estudio para la resistencia a los diferentes antibióticos ensayados fue el mostrado en la figura 10. En la tabla 6 se señalan los antibióticos utilizados.

Tabla 6. Antibióticos utilizados para la prueba de susceptibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Abreviatura
Trimetoprin-Sulfametoxazol	STX
Levofloxacina	LEV

Para estos aislados, en el laboratorio se determino previamente la producción de B-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) (Chalbaud, 2010). Los resultados se muestran en la tabla 20

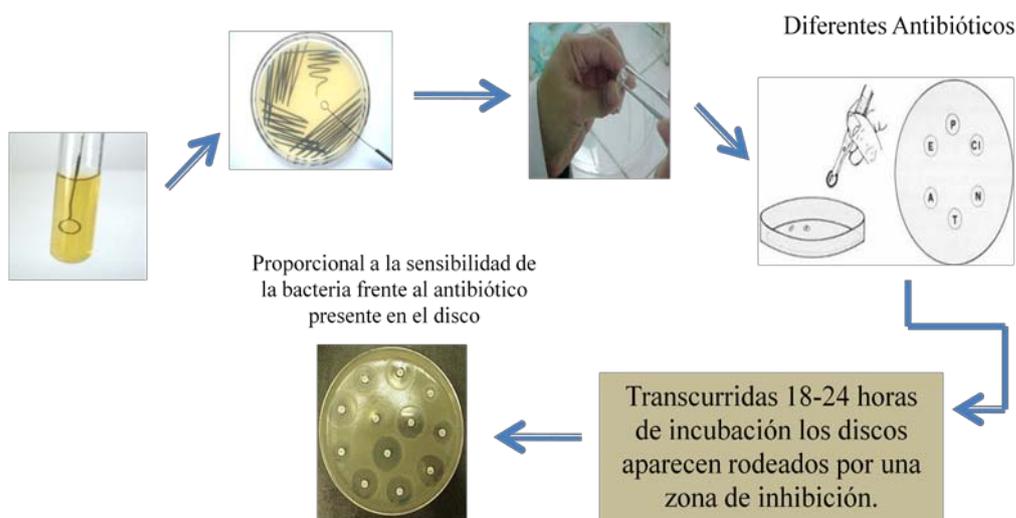
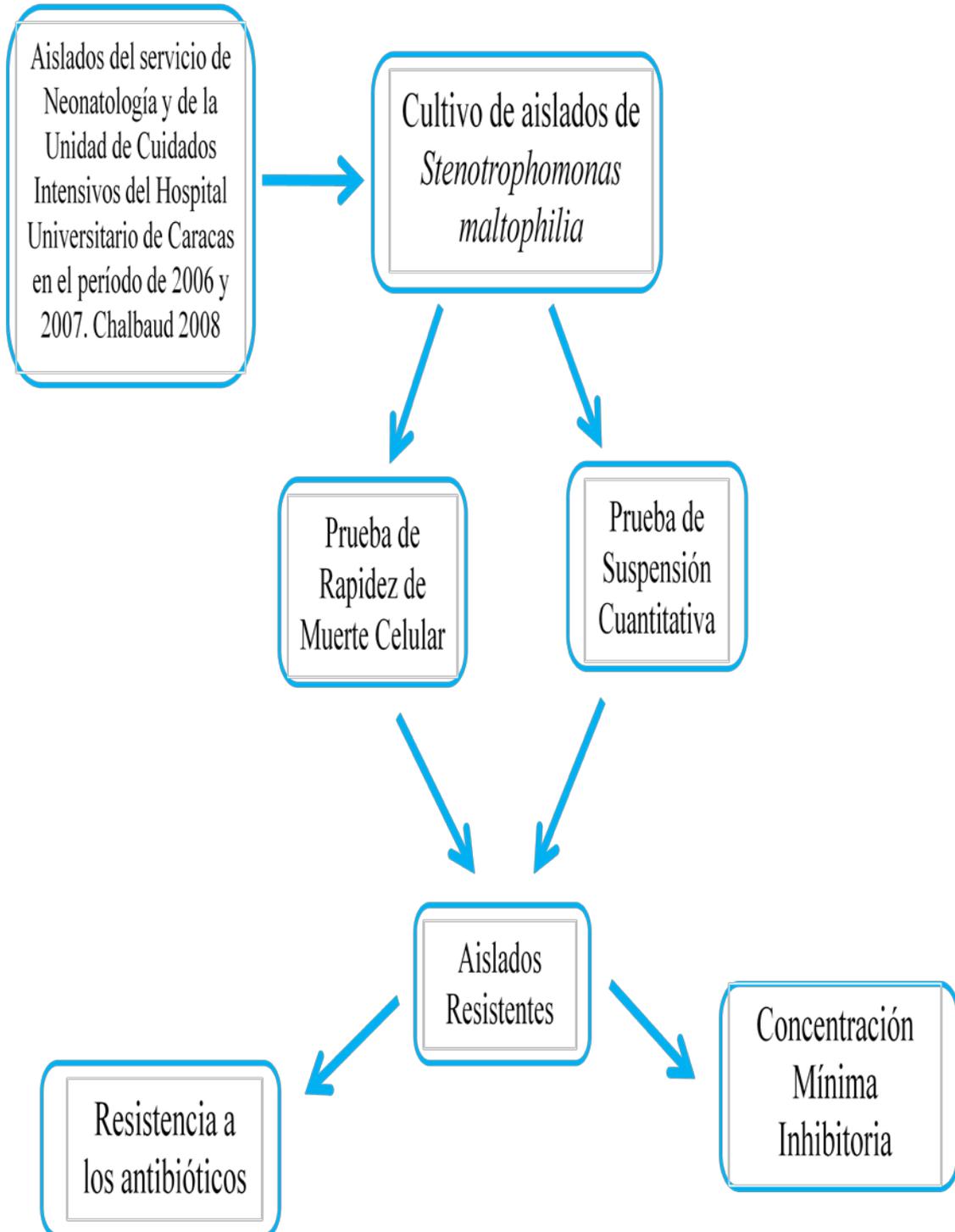


Figura 10. Protocolo para determinar la resistencia a antibióticos de los aislados evaluados en este estudio de *S. maltophilia*.

6. PLAN DE TRABAJO



7. RESULTADOS

7.1 CURVA DE CRECIMIENTO

A los fines de determinar los tiempos de crecimiento de los aislados analizados en este trabajo, se realizó en primer lugar una curva de crecimiento, para determinar el tiempo necesario para garantizar que los cultivos se encuentren en fase exponencial o en fase estacionaria de la curva de crecimiento.

En la figura 11 se muestra la gráfica obtenida que muestra el crecimiento bacteriano de estos aislados y la fase en que se encuentran.

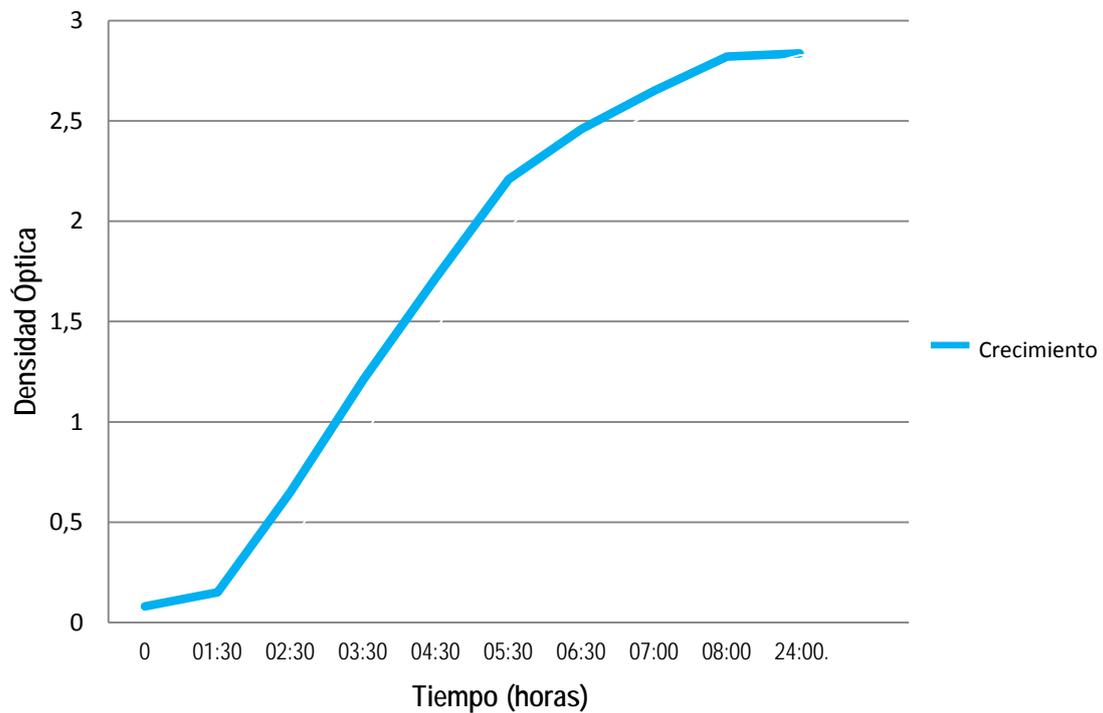


Figura 11. Representación Gráfica de las fases de crecimiento de los aislados de *S. maltophilia*.

En la figura 11, se observa las fases de crecimiento de los aislados de *S. maltophilia* evidenciando que a las 2 horas los aislados que se evaluaron en este trabajo se encontraban en el inicio del estado exponencial, y que a las 24 horas de crecimiento, es equivalente al estado estacionario.

7.2. CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS EN PRESENCIA DE LOS AGENTES DESINFECTANTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

7.2.1 Prueba de Rapidez De Muerte Celular

Con la finalidad de determinar la resistencia a los agentes activos de los desinfectantes utilizados en este estudio, que son de uso común en nuestro país, y que se encuentra presente en los aislados de *S. maltophilia* provenientes de las diferentes áreas y de pacientes del Hospital Clínico Universitario, se realizó el crecimiento de los diferentes aislados bacterianos en presencia de los dos desinfectantes, los cuales uno de ellos presenta como agente activo el Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio, en una concentración del 10 % y el otro producto comercial evaluado presenta como agente activo el Polimetilen diurea al 5%. También se evaluó el efecto de estos desinfectantes en las diferentes fases de crecimiento tanto en estado Exponencial (2 horas), como el Estacionario (24 horas), y a distintas diluciones. En las tablas número 7, 8, 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos por medio de la prueba de Rapidez de Muerte Celular con los diferentes agentes desinfectantes en un tiempo de exposición de 2 minutos, en las dos fases de crecimiento evaluadas

Tabla 7. Capacidad de crecimiento de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del producto con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%. Se ensayaron cultivos en fase exponencial, con un tiempo de exposición de 2 min., evaluado mediante la prueba de Rapidez de Muerte Celular.

Aislados	Crecimiento en fase exponencial con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10 %	
	Sin desinfectante	Desinfectante sin diluir (SD)
SU1	+	+
SU2	+	-
SU3	+	+
SU4	+	-
SU5	+	+
SU6	+	-
SU7	+	-
SN1	+	-
SB1	+	-
SB2	+	+
SB3	+	-
SB4	+	-
SB5	+	+
SB6	+	-
SB7	+	-
J62-2	+	-

Prueba de Rapidez de Muerte Celular con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% a las 2 horas de crecimiento en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. J62-2: *E. coli* control negativo (CVCM).

Según los resultados de la Tabla 7, se puede concluir que 5 (33%) de los 15 aislados evaluados en fase de crecimiento exponencial, fueron capaces de crecer con el producto sin diluir (Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10%), en un tiempo de exposición 2 minutos, de los cuales, tres fueron aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Universitario Caracas y dos de pacientes hospitalizados en HUC.

Tabla 8. Capacidad de crecimiento de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del producto con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%. Se ensayaron cultivos en fase estacionario, con un tiempo de exposición de 2 min., evaluado mediante la prueba de Rapidez de Muerte Celular.

Aislados	Crecimiento en fase estacionaria con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10 %	
	Sin desinfectante	100
SU1	+	+
SU2	+	-
SU3	+	+
SU4	+	-
SU5	+	+
SU6	+	+
SU7	+	-
SN1	+	-
SB1	+	-
SB2	+	+
SB3	+	-
SB4	+	+
SB5	+	+
SB6	+	-
SB7	+	-
J62-2	+	-

Prueba de Rapidez de Muerte Celular con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% a las 24 horas de crecimiento en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. J62-2: *E. coli* control negativo

En la tabla 8, se evidencia que 7 (46%) de los aislados evaluados en estado estacionario fueron capaces de crecer en presencia del producto sin diluir (QAC 10%), en el tiempo de exposición de 2 minutos. Cuatro de los aislados son provenientes de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva y tres fueron aislados de pacientes hospitalizados en HUC.

Tabla 9. Capacidad de crecimiento de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del producto con el agente activo Polimetilen diurea al 5%. Se ensayaron cultivos en fase exponencial, con un tiempo de exposición de 2 min., evaluado mediante la prueba de Rapidez de Muerte Celular.

Aislados	Crecimiento en fase exponencial con el agente activo Polimetilen diurea al 5%	
	Sin desinfectante	100
SU1	+	-
SU2	+	-
SU3	+	-
SU4	+	-
SU5	+	-
SU6	+	-
SU7	+	-
SN1	+	-
SB1	+	-
SB2	+	+
SB3	+	-
SB4	+	-
SB5	+	-
SB6	+	-
SB7	+	-
J62-2	+	-

Prueba de Rapidez de Muerte Celular con Polimetilen diurea al 5% a las 2 horas de crecimiento en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. J62-2: *E. coli* control negativo (CVCM).

Según los resultados de la Tabla 9, de los 15 aislados evaluados, uno solo fue capaz de crecer en presencia del producto sin diluir (Polimetilen diurea 5%) con una exposición de dos minutos, este es proveniente de pacientes hospitalizados.

Tabla 10. Capacidad de crecimiento de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del producto con el agente activo Polimetilen diurea al 5%. Se ensayaron cultivos en fase estacionaria, con un tiempo de exposición de 2 min., evaluado mediante la prueba de Rapidez de Muerte Celular.

Aislados	Crecimiento en fase estacionaria con el agente activo Polimetilen diurea al 5%	
	Sin Desinfectante	100
SU1	+	+
SU2	+	-
SU3	+	-
SU4	+	-
SU5	+	-
SU6	+	-
SU7	+	-
SN1	+	-
SB1	+	-
SB2	+	+
SB3	+	-
SB4	+	-
SB5	+	+
SB6	+	-
SB7	+	-
J62-2	+	-

Prueba de Rapidez de Muerte Celular con Polimetilen diurea al 5% a las 24 horas de crecimiento en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. J62-2: *E. coli* control negativo.

En tabla 10, se evidencia que de los 15 aislados evaluados bajo el efecto de este desinfectante que presenta como agente activo el Polimetilen diurea al 5%, 3 (25%) aislados en fase estacionaria de crecimiento fueron capaces de crecer bajo el efecto de este desinfectante, en las que solo 1 (8%) es un aislado proveniente de distintas superficies inanimada del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva y 2 (16,6 %) de pacientes hospitalizados en HUC.

En la figura 12, se muestra una representación gráfica del número de aislados de *Stenotrophomonas maltophilia*, que fueron capaces de crecer con los desinfectantes sin diluir, luego de estar en contacto por un tiempo de 2 min. En la gráfica se observa también los resultados

obtenidos con los aislados en las 2 fases de crecimiento en las que fueron evaluadas la capacidad de resistencia.

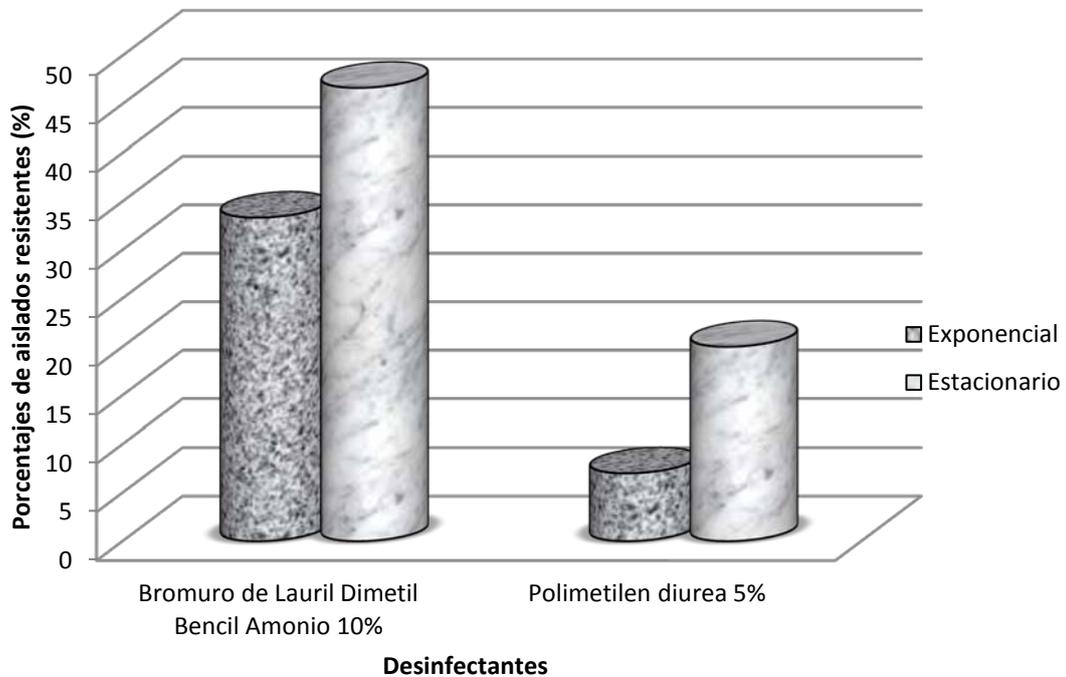


Figura 12. Porcentajes de *Stenotrophomonas maltophilia* resistentes a los diferentes desinfectantes ensayados.

En la figura 12, se muestra los porcentajes de los aislados que fueron capaces de crecer con los desinfectantes sin diluir, en los dos estados de crecimientos evaluados en este estudio, evidenciando que si existe una diferencia de susceptibilidad al considerar la fase de crecimiento en la cual se encuentran. La figura muestra, que al encontrarse en la fase estacionaria de crecimiento el 47% es capaz de crecer con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Amonio al 10 % y el 20 % con el agente activo Polimetilen diurea al 5%. Sin embargo, cuando se evaluaron en estado exponencial, los porcentajes fueron menores mostrando que solo el 33% es capaz de crecer con el agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Amonio al 10 % y el 7% con el agente activo Polimetilen diurea al 5%.

Los aislados que mostraron resistencia fueron:

QAC, en Fase Exponencial: SU1, SU3, SU5, SB2 y SB5.

QAC, en Fase Estacionaria: SU1, SU3, SU5, SU6, SB2, SB4 y SB5.

Polimetilen diurea en Fase Exponencial: SB2.

Polimetilen diurea en Fase Estacionaria: SU1, SB2 y SB5.

7.2.2 Prueba de Suspensión Cuantitativa.

Con el fin de cuantificar los resultados de los aislados bacterianos que fueron capaces de crecer en presencia de los dos desinfectantes ensayados, se realizó la prueba de suspensión cuantitativa, expresando los resultados como crecimiento ó ausencia de crecimiento. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12 en donde no se evidencia ningún cambio en cuanto el orden de magnitud, la dilución realizada para llevar a cabo esta prueba fue de 10^{-8} .

Tabla 11. Crecimiento de los aislados *Stenotrophomonas maltophilia* que fueron capaces de crecer con el producto comercial, evaluados por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%.

AISLADOS	Crecimiento con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10 %	
	Exponencial	Estacionario
SU1	+	+
SU3	+	+
SU5	+	+
SU6	-	+
SB2	+	+
SB4	-	+
SB5	+	+

(+)= Crecimiento. (-)= Ausencia de crecimiento.

Estos resultados mostrados en la tabla 11, evidencia que los aislados evaluados mediante la prueba de Rapidez de Muerte Celular, si fueron capaces de crecer con el desinfectante sin diluir y que los valores de UFC se mantuvieron cercanos, no encontrando diferencias en cuanto al orden de magnitud en aquellas que crecieron en las dos fases de crecimiento. Se evidenció que dos aislados, como son SU6 y SB4, no fueron capaces de crecer cuando el producto comercial se encuentra sin diluir y cuando estos aislados se encontraban en fase exponencial de crecimiento.

Tabla 12. Crecimiento de los aislados *Stenotrophomonas maltophilia* por medio de la Prueba de Suspensión Cuantitativa con Polimetilen diurea al 5%.

AISLADOS	Crecimiento Con Polimetilen diurea al 5%	
	Exponencial	Estacionario
	SD	SD
SU1	-	+
SB2	+	+
SB5	-	+

(+)= Crecimiento. (-)= Ausencia de Crecimiento. (SD)= Desinfectante sin diluir

En la tabla 12 se muestra, aquellos aislados que fueron capaces de crecer con el desinfectante Polimetilen diurea al 5% cuando se encontraba sin diluir. Solo un aislado fue capaz de crecer al ensayar con la Prueba de Suspensión Cuantitativa, cuando se encontraba en fase exponencial de crecimiento, corroborando así los resultados de la Prueba de Rapidez de Muerte Celular que es una prueba cualitativa. Solo tres aislados fueron capaces de crecer cuando se encuentra en fase estacionaria de crecimiento. El orden de magnitud de los valores de UFC se mantuvo similares.

7.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Con el fin de determinar la mínima concentración de los agentes ensayados que es capaz de inactivar o inhibir el crecimiento en la bacteria estudiada, se realizó la Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria para cada aislado.

En la tabla 13, se muestra a que dilución fue capaz de crecer cada aislado, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria con el desinfectante que presenta como agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%, cuando el cultivo se encuentra es fase exponencial del crecimiento.

Tabla 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10% en estado exponencial de crecimiento.

Aislados	Crecimiento en fase exponencial a diferentes diluciones del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10 %					
	Sin desinfectante	5	10	20	50	100
SU1	+	+	+	+	+	+
SU2	+	+	+	-	-	-
SU3	+	+	+	+	+	+
SU4	+	+	+	-	-	-
SU5	+	+	+	+	+	+
SU6	+	+	+	+	+	-
SU7	+	+	+	-	-	-
SN1	+	+	-	-	-	-
SB1	+	+	+	-	-	-
SB2	+	+	+	+	+	+
SB3	+	+	+	-	-	-
SB4	+	+	+	+	+	-
SB5	+	+	+	+	+	+
SB6	+	+	+	-	-	-
SB7	+	+	-	-	-	-
J62-2	+	-	-	-	-	-

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. **J62-2**: *E. coli* control negativo

Los resultados de la Tabla 13, corroboran que 5 (33%) de los 15 aislados evaluados en fase de crecimiento exponencial, fueron capaces de crecer con el producto sin diluir (Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10%), en un tiempo de exposición 2 minutos. Entre estos aislados que mostraron ser resistente al desinfectante al 100% (10% QAC), tres (20%) fueron aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva y dos (13%) de pacientes hospitalizados en HUC. Al observar las demás diluciones realizadas, se aprecia que de los aislados evaluados solo dos (13%) de los aislados fueron capaces de crecer solamente hasta una dilución del 50% del producto comercial (5% QAC), seis (40%) hasta una dilución del 10% (1% QAC) y los dos (13%) restantes crecieron solo en una dilución del 5% (0,5% QAC).

En la tabla 14, se muestran los resultados obtenidos de aquellos aislados que fueron capaces de crecer a distintas diluciones del desinfectante con agente activo Bromuro Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%, pero cuando los cultivos se encontraban en fase estacionaria de crecimiento.

Tabla 14. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10% en estado estacionario de crecimiento.

Aislados	Crecimiento en fase estacionaria a diferentes diluciones del agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10 %					
	Sin desinfectante	5	10	20	50	100
SU1	+	+	+	+	+	+
SU2	+	+	+	-	-	-
SU3	+	+	+	+	+	+
SU4	+	+	+	-	-	-
SU5	+	+	+	+	+	+
SU6	+	+	+	+	+	+
SU7	+	+	+	+	-	-
SN1	+	+	+	-	-	-
SB1	+	+	+	+	-	-
SB2	+	+	+	+	+	+
SB3	+	+	+	+	-	-
SB4	+	+	+	+	+	+
SB5	+	+	+	+	+	+
SB6	+	+	+	+	-	-
SB7	+	+	-	-	-	-
J62-2	+	-	-	-	-	-

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria con Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10% en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. **J62-2**: *E. coli* control negativo

En la tabla 14, se corrobora que 7 (47%) de los aislados evaluados en estado estacionario fueron capaces de crecer en presencia del producto sin diluir (QAC 10%) desinfectante en el tiempo de exposición de 2 minutos. De estos siete aislados que mostraron resistencia al desinfectante sin diluir, solo cuatro (27%) de los aislados son provenientes de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva y tres (20%) fueron aislados de pacientes hospitalizados en HUC. En esta tabla también se muestra los resultados de las otras diluciones de desinfectantes que fueron evaluadas en este estudio y se observó que cuatro (27%) de los aislados fueron capaces de crecer hasta una hasta una dilución del 20% (2% QAC), tres (20%) hasta una dilución del 10% (1% QAC) y uno (7%) restantes crecieron en

una dilución del 5% (0,5% QAC). Según estos resultados todos los aislados de *S. maltophilia* evaluados en la fase estacionaria de crecimiento son capaces de resistir el efecto de los compuestos QAC a concentraciones de 0,5% con un tiempo de exposición de dos minutos.

En la tabla 15, se muestran los resultados obtenidos de los aislados que fueron capaces de crecer a las diferentes diluciones del desinfectante con agente activo Polimetilen diurea al 5%, cuando se encontraban en estado exponencial de crecimiento, de manera de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de cada aislado.

Tabla 15. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del agente activo Polimetilen diurea al 5% estado exponencial de crecimiento.

Aislados	Crecimiento en fase exponencial a diferentes diluciones del agente activo Polimetilen diurea al 5%					
	Sin desinfectante	5	10	20	50	100
SU1	+	+	+	+	+	-
SU2	+	-	-	-	-	-
SU3	+	+	+	+	-	-
SU4	+	-	-	-	-	-
SU5	+	+	+	+	-	-
SU6	+	+	+	+	-	-
SU7	+	+	-	-	-	-
SN1	+	-	-	-	-	-
SB1	+	+	-	-	-	-
SB2	+	+	+	+	+	+
SB3	+	-	-	-	-	-
SB4	+	+	+	+	-	-
SB5	+	+	+	+	+	-
SB6	+	-	-	-	-	-
SB7	+	-	-	-	-	-
J62-2	+	-	-	-	-	-

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria con polimetilen diurea al 5% en *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. **J62-2**: *E. coli* control negativo

Según los resultados de la Tabla 15, se corroboró que de los 15 aislados evaluados, uno solo fue capaz de crecer en presencia del producto sin diluir (Polimetilen diurea 5%) con un tiempo de exposición de dos minutos, y este es proveniente de pacientes hospitalizados. Dos (13%) de los aislados crecieron hasta una dilución del 50% del producto comercial (2,5% Polimetilen diurea), cuatro (27%) hasta una dilución del 20% (1% Polimetilen diurea), y solo dos fueron capaces de crecer en una dilución del 5% (0,25% Polimetilen diurea) únicamente.

En la tabla 16, se muestran los resultados obtenidos al determinar la Concentración Mínima Inhibitoria con el desinfectante Polimetilen diurea al 5% en los aislados bacterianos de *S. maltophilia*, cuando estos se encontraban en fase estacionaria de crecimiento.

Tabla 16. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los aislados de *Stenotrophomonas maltophilia* en presencia del agente activo Polimetilen diurea al 5% estado estacionario de crecimiento

Aislados	Crecimiento en fase estacionaria a diferentes diluciones del agente activo Polimetilen diurea al 5%					
	Sin Desinfectante	5	10	20	50	100
SU1	+	+	+	+	+	+
SU2	+	-	-	-	-	-
SU3	+	+	+	+	+	-
SU4	+	+	-	-	-	-
SU5	+	+	+	+	+	-
SU6	+	+	+	+	+	-
SU7	+	+	+	-	-	-
SN1	+	-	-	-	-	-
SB1	+	+	+	-	-	-
SB2	+	+	+	+	+	+
SB3	+	+	-	-	-	-
SB4	+	+	+	+	+	-
SB5	+	+	+	+	+	+
SB6	+	-	-	-	-	-
SB7	+	-	-	-	-	-
J62-2	+	-	-	-	-	-

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria con Polimetilen diurea al 5% en aislados de *S. maltophilia*. (-)= ausencia de crecimiento. (+)= crecimiento. **SU**: aislados de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva del HUC. **SN**: aislado de superficies inanimadas del ambiente del Servicio de Neonatología del HUC. **SB**: aislados de pacientes hospitalizados en el HUC. **J62-2**: *E. coli* control negativo

En tabla 16, se corrobora que de los 15 aislados evaluados bajo el efecto de este desinfectante que presenta como agente activo el Polimetilen diurea al 5%, solo 3 (20%) fueron capaces de crecer bajo el efecto de este desinfectante, entre que 1 (7%) es un aislado proveniente de distintas superficies inanimadas del ambiente de la Unidad de Terapia Intensiva y 2 (13 %) de pacientes hospitalizados en HUC. Sin embargo, se encuentran diferencias con respecto a los otros aislados evaluados en los que se puede observar que 4 (27%) aislados fueron capaces de crecer hasta el 50% (2,5 % Polimetilen diurea al 5%) del desinfectante, 2 (13%) hasta el 10% (0,5% Polimetilen diurea) y solo dos (13%) aislado hasta el 5% (0,25% Polimetilen diurea al 5%).

De los 15 aislados evaluados de *S. maltophilia*, 3 en estado estacionario y 1 en estado exponencial fueron capaces de crecer en presencia del desinfectante polimetilen diurea al 5 %, el resto de los aislados resultaron ser sensibles al 100% del desinfectante comercial. Estos resultados nos permiten sugerir que este producto, es el desinfectante más eficaz en la eliminación de las bacterias evaluadas en este estudio, en comparación del otro desinfectante ensayado que contiene QAC.

En la tabla 17, se muestra un resumen de los datos mostrados anteriormente, en la que se precisa hasta que dilución fue capaz de crecer cada aislado con respecto a cada desinfectante ensayado.

Tabla 17. Diluciones a las que los aislados fueron capaces de resistir cuando se encontraban en presencia de los desinfectantes ensayados en este estudio

Aislados	Estacionario		Exponencial	
	D1	D2	D1	D2
SU1	SD	SD	SD	1:2
SU2	1:10	-	1:10	-
SU3	SD	1:2	SD	1:5
SU4	1:10	1:20	1:10	-
SU5	SD	1:2	SD	1:5
SU6	SD	1:2	1:2	1:5
SU7	1:5	1:10	1:10	1:20
SB1	1:5	1:10	1:10	1:20
SB2	SD	SD	SD	SD
SB3	1:5	1:20	1:10	-
SB4	SD	1:2	1:2	1:5
SB5	SD	SD	SD	1:2
SB6	1:5	-	1:10	-
SB7	1:20	-	1:20	-
SN1	1:10	-	1:20	-

D1= Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%. D2= Polimetilen diurea al 5 %. SD= Sin diluir. (-)= Ausencia de crecimiento.

En las figuras 13 y 14, se muestra la representación gráfica de la resistencia de cada aislado con respecto a las diluciones a las cuales estos aislados fueron capaces de crecer en presencia de los dos desinfectantes evaluados en este trabajo y cuando se encontraban en fase estacionaria y exponencial crecimiento.

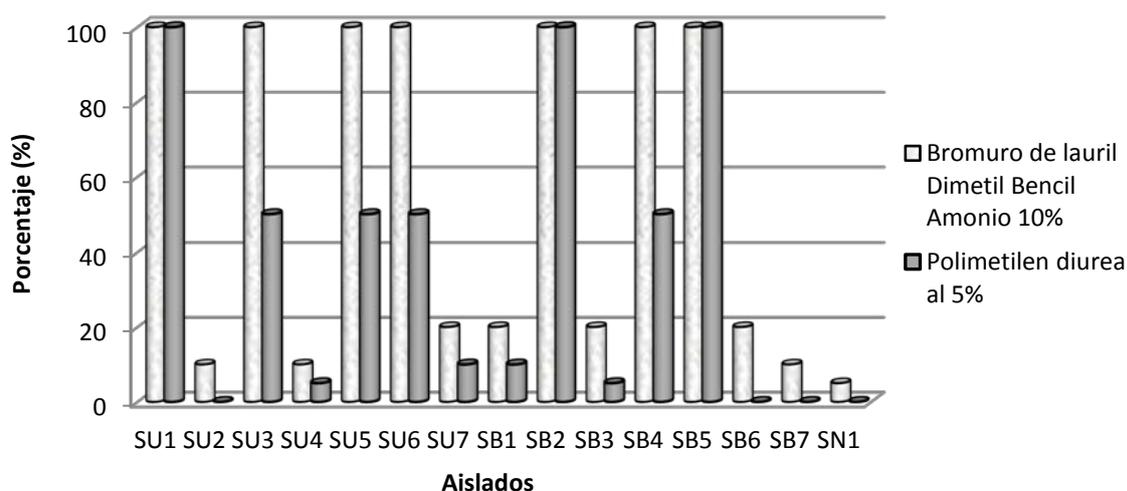
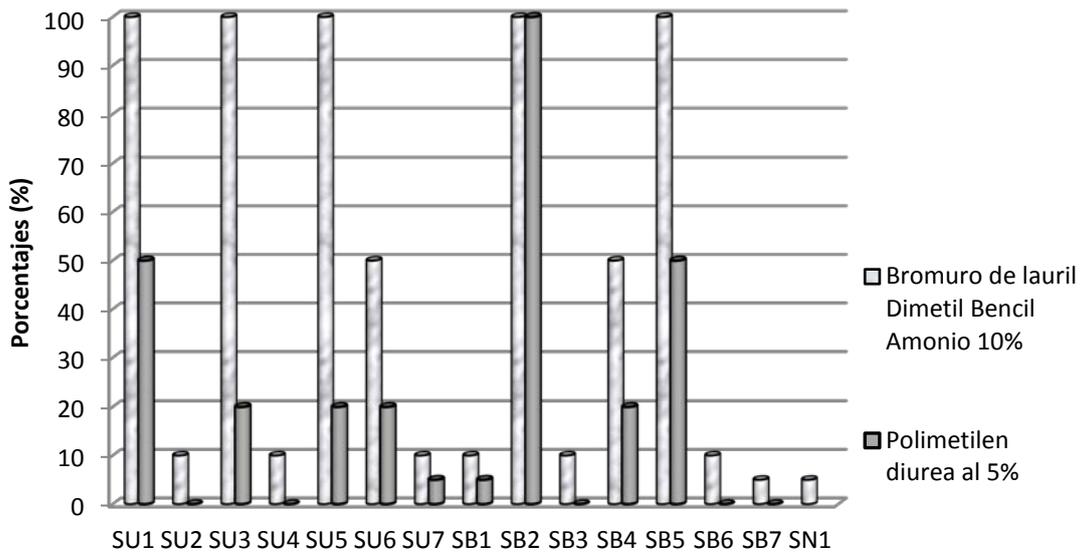


Figura 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de cada uno de los aislados bajo la presencia de los dos desinfectantes, cuando se encontraban en fase estacionaria.



Aislados

Figura 14. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de cada uno de los aislados bajo la presencia de los dos desinfectantes, cuando se encontraban en fase exponencial

7.4 Resistencia a Antibióticos

Con el fin de corroborar si los aislados que se utilizaron en este estudio son resistentes a algunos antibióticos además de los desinfectantes, se realizaron antibiogramas que nos permitieron evaluar los perfiles de resistencia de *Stenotrophomonas maltophilia*. Los perfiles de resistencia obtenidos para los antibióticos ensayados en este estudio para este género bacteriano se muestran en la tabla 18.

En la tabla 18 se muestran, los fenotipos de resistencia de los aislados evaluados en esta trabajo a los antibióticos.

Tabla 18. Fenotipo de resistencia de *Stenotrophomonas maltophilia* a los antibióticos ensayados

Aislado	LEV	STX
	R/S	R/S
SB1	S	S
SB2	S	S
SB3	S	S
SB4	S	S
SB5	S	S
SB6	S	S
SB7	S	S
SU1	S	S
SU2	S	S
<u>SU3</u>	S	R
SU4	S	S
SU5	S	S
SU6	S	S
SU7	S	S
SN1	S	S

LEV: levofloxacina. STX: Trimetoprim-sulfametoxazol. R: resistente, S: sensible

En la tabla 18, se puede observar que a diferencia de las demás muestras pertenecientes a la especie de *Stenotrophomonas maltophilia*, entre las muestras ambientales colectadas de la UTI, un solo aislado de la muestra colectado del mesón del área de lavado (SU3, subrayado en la Tabla 18), mostró ser resistente a STX.

Datos previos del laboratorio determinaron la presencia de β -Lactamasas de espectro extendido en los aislados que se evaluaron en este trabajo. En la tabla 19, se muestran, los resultados de las pruebas fenotípicas de los aislados de *S.maltophilia*, positivos para BLEE, en los que se observó que el 80% resultó ser positivo para BLEE.

Tabla 19. Aislados de *S.maltophilia* positivos para la presencia de BLEE.

Pacientes	Aislados Ambiente de SN	Ambiente de UTI
SB1	SN1	SU2
SB2		SU4
SB3		SU5
SB4		SU6
SB5		SU7
SB6		
SB7		

En la tabla 20, se muestra un resumen de los resultados obtenidos para todas las pruebas realizadas en este trabajo, mostrando los aislados que fueron resistentes a cada desinfectante, en cada fase de crecimiento y los antibióticos que fueron evaluados. Se señalan las concentraciones (expuestas en porcentaje) de cada agente activo.

Tabla 20. Resumen de los resultados de las pruebas a los aislados *S. maltophilia*.

Aislados	D1	D2	D1	D2	Antibiótico	BLEE
	Exponencial		Estacionario		STX	
SU1	10%	2,5%	10%	5%	S	-
SU2	1%	NC	1%	NC	S	+
SU3	10%	1%	10%	2,5%	R	-
SU4	1%	NC	1%	0,25%	S	+
SU5	10%	1%	10%	2,5%	S	+
SU6	5%	1%	10%	2,5%	S	+
SU7	1%	0,25%	2%	0,5%	S	+
SN1	0,5%	NC	0,5%	NC	S	+
SB1	1%	0,25%	2%	0,5%	S	+
SB2	10%	5%	10%	5%	S	+
SB3	1%	NC	2%	0.25%	S	+
SB4	5%	1%	10%	2,5%	S	+
SB5	10%	2,5%	10%	5%	S	+
SB6	1%	NC	2%	NC	S	+
SB7	0,5%	NC	0,5%	NC	S	+

Se expresa la concentración del agente activo en los productos desinfectantes. D1: Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio 10% D2: Polimetilen diurea al 5%. S: Sensibles. R: Resistente. (+): Presencia de BLEE. (-): Ausencia de BLEE. NC: No crecimiento

8. DISCUSIÓN

La resistencia de los microorganismos a múltiples sustancias es un problema de salud pública observado a nivel mundial, en especial después de la aparición y uso masivo de los antibióticos. La causa de este problema ha sido, y todavía es, el inapropiado y excesivo uso de los antibióticos. Del mismo modo, se ha incrementado el uso de otros agentes antimicrobianos como los biocidas, que incluyen a los antisépticos y a los desinfectantes. La infección nosocomial o infección intrahospitalaria (que aparece después de 72 horas del ingreso del paciente al centro de salud), representa un problema relevante de salud pública de gran trascendencia económica y social, además de constituir un desafío para las instituciones de salud y el personal médico responsable de su atención en las unidades donde se llegan a presentar. Son de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad de la población.

Entre los factores que favorecen la colonización bacteriana en el hombre se destacan: el estado físico del individuo, la edad, la estancia hospitalaria y la administración de antimicrobianos. También existen otros factores propios del ambiente hospitalario, que deberían ser más fáciles de controlar, tales como desinfección de las áreas de hospitalización, de catéter e instrumentos, limpieza de vestimenta y manos del personal (Guzmán, 2006).

Son muy pocos los estudios realizados en Venezuela para evaluar la resistencia que pueden presentar estos microorganismos a los diversos antimicrobianos utilizados comúnmente, como son: los antibióticos y los biocidas. Sin embargo en años recientes se han visto incrementados estos estudios, debido al abuso y uso de estos antimicrobianos, que han conllevado a la selección de cepas resistentes, ocasionando que esta resistencia pueda ser transferida por diversos mecanismos a la descendencia. Estos mecanismos son los responsables de las complicaciones actuales en el manejo de las enfermedades infecciosas y son una razón por la cual estos

microorganismos pueden crecer en presencia de un antimicrobiano, a pesar de que este se encuentre en las máximas concentraciones (Russell y col., 1998).

Stenotrophomonas maltophilia, es un patógeno emergente importante, especialmente en las áreas de cuidado intensivo, debido a su potencial de causar dificultades en el tratamiento de infecciones nosocomiales, su tasa de aislamiento de pacientes ha aumentado y las infecciones que causa son en la actualidad difíciles de tratar, ya que presentan resistencia intrínseca a muchos antibióticos de amplio espectro (Barchitta y col., 2009)

8.1 CURVA DE CRECIMIENTO

Con el fin de evaluar el tiempo requerido por los aislados analizados para alcanzar la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento (figura 11), en la cual se evidencia que las bacterias a las 2 horas se encontraban en el inicio de la fase exponencial y que a las 24 horas se encontraban en fase estacionaria de crecimiento. Estos tiempos fueron tomados para los experimentos posteriores.

La curva normal de crecimiento bacteriano presenta 4 fases: 1) fase de transición o "lag", 2) fase logarítmica o exponencial, 3) fase de transición y 4) fase estacionaria. La fase "lag" representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional. Un cultivo bacteriano generalmente se inicia al inocular el medio de cultivo con un número pequeño de bacterias en fase estacionaria. En los primeros minutos posteriores al inicio del cultivo, se recupera el nivel normal de tensión helicoidal del DNA e incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento (Reyes y col., 2003). Posteriormente, se reinicia la replicación del cromosoma y se presenta la primera división de la mayoría de las células, comenzando así la fase exponencial, que representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo

celular e incrementan su número exponencialmente (García y col., 1987). La fase de transición, o de crecimiento no balanceado, se inicia cuando disminuyen los nutrientes. En esta transición cambia la pendiente de la curva de crecimiento exponencial y disminuye la velocidad de síntesis de macromoléculas. La disminución de la síntesis de DNA y proteínas no es sincrónica, lo que ocasiona un incremento en la relación DNA/proteína. Por otra parte, la división celular continúa a una velocidad similar a la de la fase exponencial, lo que genera células de menor tamaño. Finalmente, cuando los nutrientes se agotan, las células entran a la fase estacionaria. El inicio de esta fase se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía. En estos cultivos la fase exponencial representa el periodo de rápida división celular o de crecimiento balanceado, mientras que la fase estacionaria representa el periodo de crecimiento nulo. Las bacterias que no esporulan en respuesta al ayuno nutricional, presentan cambios morfológicos y fisiológicos importantes al ingresar a la fase estacionaria (Nyström, 2004). Entre estos cambios se encuentran modificaciones del metabolismo bacteriano y los cambios en la estructura de la envoltura celular. Estos cambios no representan un estadio final con suspensión total del metabolismo, como en la esporulación, sino un estadio dinámico en el que se mantiene un metabolismo basal aun después de semanas en ayuno (Hengge, 2000). Esta condición se logra mediante la expresión oportuna de genes que se organizan en redes de regulación. La respuesta genética al estrés nutricional varía en relación al tiempo que tienen las células en fase estacionaria, la oxigenación, el pH, la temperatura y el primer nutriente que se agota (fuente de carbono, nitrógeno o fosfato), entre otros factores.

8.2 CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS EN PRESENCIA DE LOS AGENTES DESINFECTANTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

Los bacilos Gram negativos han surgido como los principales patógenos nosocomiales, convirtiéndose en los responsables de los brotes epidemiológicos en los ambientes hospitalarios, a pesar de la implementación de estrategias específicas para su control (Matró y col., 2003). Los hospitales sirven como reservorio de estos patógenos nosocomiales, seleccionando multirresistencia, la cual surge como consecuencia del uso inadecuado de los antimicrobianos. Es por ello que en este trabajo se evaluó la capacidad de resistencia de *S. maltophilia*, ya que se encuentra entre los tres patógenos aislados con mayor frecuencia en los centros hospitalarios. Para fines comparativos se realizó el crecimiento de los cultivos en presencia de dos desinfectantes comerciales de uso común en hospitales y centros de salud, perteneciendo uno a la familia de los QACs y cuyo agente activo es el Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio, en una concentración del 10% y un segundo desinfectante cuyo agente activo es Polimetilen diurea 5%, libre de compuestos cuaternarios de amonio, que ha demostrado ser altamente eficiente contra organismos Gram negativos.

Los resultados demuestran que de los 15 aislados evaluados de *S. maltophilia*, el 47% resultó ser resistente a la acción del agente desinfectante con QAC al 10%. El 20% de los aislados bacterianos son resistentes a ambos agentes antimicrobianos ensayados. Es importante destacar que de los 7 aislados que son capaces de crecer con QAC al 10%, 3 aislados también son capaces de crecer con el desinfectante libre de compuestos cuaternarios de amonio (figuras 13 y 14). Los resultados mostraron diferencias, cuando se evaluaron los aislados en estado exponencial de crecimiento, mostrando mayor sensibilidad a los desinfectantes cuando se encontraban en esta fase de crecimiento.

Cuando la célula bacteriana alcanza la fase estacionaria de crecimiento, en la bacteria ocurren cambios dramáticos en la estructura y fisiología de las mismas, ya que en esta fase disminuye el volumen celular y las bacterias se redondean, disminuye la tasa global de síntesis de DNA, RNA y proteínas, aumenta la degradación de proteínas, se reorganiza el metabolismo general y se acumulan compuestos de reserva (polifosfato y glucógeno) y osmoprotección (Nyström, 2004). En la fase estacionaria disminuye la expresión de la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento exponencial y aumenta la de genes relacionados con funciones que aseguran la viabilidad celular durante la inanición. Los cambios en el metabolismo general, el aumento de los compuestos de reserva y de osmoprotección, la remodelación de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes contribuyen a que las células en fase estacionaria mantengan la viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores de estrés, como por ejemplo la radiación ultravioleta, desinfectantes, calor, antibióticos y concentraciones salinas elevadas. Estos datos sugieren que las bacterias que no esporulan, en respuesta al ayuno, presentan una diferenciación celular con algunas características similares a la esporulación (Ishihama, 2000).

En resumen, durante la fase estacionaria los cambios en la expresión genética implican una reorganización metabólica profunda. Mediante esta reorganización se mantiene la integridad celular y la de las principales macromoléculas, provocando un aumento en la resistencia celular a diferentes agentes nocivos físicos y químicos. Todo lo antes expuesto, da soporte a los resultados obtenidos en las células bacterianas evaluadas en este trabajo, que resultaron ser más resistentes cuando fueron evaluadas en la fase estacionaria de crecimiento, que cuando se evaluó la resistencia en la fase exponencial.

La resistencia que presentan estos microorganismos a los desinfectantes evaluados, puede deberse a diversos mecanismos que aumentan la expresión cuando la bacteria se encuentre en

fase estacionaria, pero que también se expresa en fase exponencial de crecimiento. Uno de los mecanismos más usados por los microorganismos para lograr esta resistencia, es la disminución de la acumulación del agente activo dentro del interior celular, y esto lo logran regulando el flujo del paso de este agente a través de la pared celular, o aumentando su expulsión.

La pared celular en bacterias Gram-negativas se compone de una membrana interna y proteínas asociadas al eflujo, el peptidoglicano, y una envoltura externa compuesta de dos capas. La membrana exterior tiene los canales de porinas, hidrofílicos, que regulan el pasaje de solutos y es el principal obstáculo para la penetración de los agentes hidrofílicos (Denyer y Maillard, 2002). El componente lipopolisacárido es responsable de la impermeabilidad de la membrana externa, y las alteraciones de este componente permiten mejorar la penetración de los biocidas (McDonnell y Russell, 1999). Además, los cambios en la membrana externa afectan el tamaño de los canales de porinas o alteran la expresión de las porinas, resultando en una menor susceptibilidad a los biocidas utilizados (Denyer y Maillard, 2002)

8.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La acción de los biocidas es distinta según el tipo de microorganismo, debido a sus distintas características. Tanto la composición química como su estructura, fisiología, replicación y metabolismo. Típicamente, los biocidas actúan sobre múltiples puntos o dianas; al afectar a diversos componentes, es muy difícil distinguir entre los efectos primarios y secundarios que provocan y que contribuyen a la muerte o la destrucción de los microorganismos.

La acción que ejerce polimetilen diurea sobre las bacterias es debida a la disociación iónica en iones hidroxilo, inhibiendo las enzimas de la membrana citoplasmática, produciendo una alteración

química de los componentes orgánicos y en el transporte de nutrientes, causando un efecto tóxico sobre la célula bacteriana. Los iones hidroxilo son radicales libres altamente oxidantes que muestran una reactividad marcada e indiscriminada (McDonnell y Russell, 1999).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos sin relación química. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Además de las vías antes descritas se ha propuesto una tercera vía para agentes catiónicos como los QAC, biguanidas y diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación (Hancock, 1984). Un ejemplo claro de resistencia mediada por la membrana externa es el caso de *P. aeruginosa* que presenta diferencias en la composición del lipopolisacárido (LPS) y el contenido de cationes, como el magnesio, que produce enlaces estables entre moléculas de LPS y como complemento a este mecanismo, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias (Cox y col., 1991), y es por esto que algunas cepas que son muy resistentes a clorhexidina, QAC, EDTA y diamidinas se han aislado de muestras clínicas. La presencia de un LPS menos ácido en la membrana externa puede ser un factor que contribuye a la resistencia intrínseca.

En la estructura de los compuestos cuaternarios de amonio se encuentra un grupo hidrofílico altamente ionizable, que probablemente enfrenta este impedimento de las porinas modificadas para poder penetrar dentro de las membranas de estas bacterias y producir la ruptura de la misma, aunque los liposacáridos también son responsables por la impermeabilidad de la membrana externa, debido a que generan una barrera para el paso de sustancias hidrofóbicas, no favoreciendo la entrada de los QAC que presentan largas cadenas hidrofóbicas. Estos mecanismos son propiedades que pueden poseer los microorganismos y puede ser la

razón por la que de los 15 aislados evaluados, 7 sean resistentes al QAC cuando se encuentra sin diluir y que los demás aislados son resistentes también, pero a concentraciones menores (Figuras 13 y 14). Además se evaluó la resistencia a diferentes concentraciones en las dos fases de crecimiento: exponencial y estacionario y se encontró diferencia ya que los aislados presentan más resistencia cuando se encuentran en la fase estacionaria. Esta diferencia puede ser explicada con lo antes expuesto, ya que las bacterias al encontrarse en fase estacionaria generan cambios, fisiológicos como metabólicos, provocando así mayor resistencia en esta fase.

Se realizaron ensayos con el fin de comparar la actividad del desinfectante perteneciente a la familia de los QAC, con la actividad del otro desinfectante que está libre de Compuestos de Amonio Cuaternario como es el Polimetilen diurea al 5% y disponible en el mercado venezolano. Los resultados obtenidos en estos ensayos, para los 15 aislados evaluados bajo el efecto de este desinfectante se muestran en las figuras 13 y 14, observándose, que solo tres aislados son capaces de crecer con el producto comercial Polimetilen diurea al 5%, cuando los aislados están en fase estacionaria de crecimiento. En cambio se encontraron diferencias cuando las bacterias se encontraban en fase exponencial de crecimiento, ya que solo 1 aislado fue capaz de crecer con esa concentración del desinfectante. Cuando se evaluaron otras concentraciones de este mismo desinfectante, en fase exponencial se encontró que solo 2 de los 15 aislados fueron capaces de crecer en las diluciones del 50% (2,5% Polimetilen diurea) y 4 aislados en las diluciones de 20%(1% polimetilen diurea) y solo 2 aislados fueron capaces de crecer a una dilución del 5% (0,25% Polimetilen diurea). Sin embargo al evaluar este desinfectante con cultivos que se encontraban en fase estacionaria, los resultado presentaron diferencias en cuanto a su crecimiento en las diluciones evaluadas, ya que los aislados SU1 y SB5, que presentaron resistencia a este mismo desinfectante en una dilución del 50% (2,5 Polimetilen diurea), fueron capaces de crecer con el producto comercial Polimetilen diurea al 5% en esta

fase estacionaria crecimiento, también los aislados SU7 y la SB1 que alcanzaron crecer en fase exponencial hasta una dilución del 5% (0,25% Polimetilen diurea) fueron capaces de crecer hasta una dilución del 10% (0,5% Polimetilen diurea) cuando los cultivos se encontraban en fase estacionaria. Esto indica que algunos aislados son más resistentes cuando se encuentran en esta fase de crecimiento (Tablas 13 a 16).

Es de destacar que los aislados SU1, SB2 y SB5 fueron resistentes al desinfectante que presenta como agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio al 10%, y también resultaron ser resistentes al Polimetilen diurea al 5%. Sin embargo los otros aislados presentaron susceptibilidad a este agente, sugiriendo que este agente es capaz de sobrepasar todas las barreras de impermeabilidad e interactuar rápidamente con su blanco celular

Este agente es una base fuerte y los efectos que este agente probablemente pudiera provocar en la célula bacteriana son: daños en la membrana citoplasmática de la bacteria, daño sobre el DNA y posible desnaturalización de las proteínas.

Nuestros resultados demuestran que los aislados de *S. maltophilia* resultaron ser más susceptibles frente al agente activo libre de QAC, aun cuando no es tan utilizado en los programas de prevención y limpieza.

Los aislados que fueron susceptibles a los dos desinfectantes ensayados en este trabajo, fueron eliminados por un efecto bactericida, y no bacteriostático, indicando la muerte total, debido a que al neutralizar la actividad de los desinfectantes, las bacterias no fueron capaces de recuperarse y crecer nuevamente en ningunas de las diluciones ensayadas.

En este estudio, el tiempo de exposición de la bacteria con el desinfectante fue de 2 minutos. El cual es un tiempo mayor que el recomendado por cada producto comercial, ya que el recomendado por la casa comercial es de 1 minuto, sugiriendo que el tiempo propuesto por las casas comerciales de estos productos y las concentraciones usadas comúnmente en los centros hospitalarios, e incluso en hogares, pudiera no ser el adecuado. El tiempo de exposición del desinfectante y la concentración de uso son factores a considerar, ya que en muchos casos, al aumentar la concentración y el tiempo de exposición se obtiene el proceso de muerte de los microorganismos de forma más efectiva. Sin embargo, aun aumentando el tiempo a 2 minutos y usando los compuestos comerciales puros, todavía existen bacterias resistentes.

La Concentración Mínima Inhibitoria, resulta una herramienta clave, ya que nos permite conocer a que concentración es capaz de ser eliminado un microorganismo y cuál es la concentración más óptima que debe ser utilizada para eliminar la presencia de estos patógenos, y que debe ser la concentración a utilizar para eliminar una población bacteriana mixta en los centros de salud.

Usualmente los aislados de las bacterias Gram negativas de hospitales son menos sensibles a los desinfectantes que las cepas de laboratorio, probablemente por las transferencias de genes mediadas por plásmidos, también, la selección y la mutación podrían jugar un papel muy importante en la permanencia de estos aislados, así como la adquisición de los componentes de la envoltura celular. Las concentraciones subinhibitorias de los antibióticos pueden causar cambios sutiles en la estructura externa de la bacteria, y estimular de esta forma el contacto célula a célula, quedando como interrogante si las concentraciones residuales de antisépticos y desinfectantes en ambientes clínicos podrían producir el mismo efecto (Davies y col., 1993).

8.4 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.

En general, las infecciones causadas por las bacterias resistentes a los antibióticos están asociadas a las mayores tasas de mortalidad intrahospitalaria, así como a las estadías prolongadas en el recinto de salud, provocando que las infecciones y las colonizaciones con este tipo de microorganismos incrementen la posibilidad que los pacientes reciban tratamientos inadecuados; explicando así en parte la alta tasa de mortalidad asociadas a infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos.

A nivel mundial, han sido reportados los bacilos Gram negativos no fermentadores, como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, como los principales causantes de infecciones nosocomiales, principalmente en las Unidades de Cuidados Crítico y Semi-Crítico. Recientemente, entre los bacilos Gram negativos se encuentra *S. maltophilia*, incluyéndose como un nuevo género de importancia clínica, que debe ser monitoreado, debido a sus características intrínsecas de la especie.

El uso continuo de los antibióticos en los hospitales y la falta de control adecuado para su uso a nivel poblacional, conlleva a la muerte de los microorganismos sensibles y a la selección de los microorganismos resistentes y, por consiguiente, a la disminución de las cepas sensibles, razón por la cual las bacterias que normalmente residen en los hospitales presentan un elevado patrón de resistencia a los diversos antibióticos.

Al evaluar la resistencia de antibióticos en los aislados *S. maltophilia* que se analizaron en este trabajo, los resultados arrojaron que casi todos los aislados evaluados fueron sensibles a los dos antibióticos ensayados que son indicados para combatir las infecciones causadas por este

organismo. Solo un aislado (SU3) resultó ser resistente a Trimetropim-Sulfametoxazol (Tabla 18) el cual fue aislado del ambiente de la UTI, así como también resultó ser resistente a QAC, mostró resistencia al Polimetilen diurea cuando se evaluó a una dilución del 50%(2,5%Polimetilen diurea) cuando se encontraba en fase estacionaria de crecimiento. Este aislado representa un riesgo, ya que además es capaz de sobrevivir en el ambiente del recinto hospitalario, ya que los aislados que mostraron mayor resistencia a los desinfectantes en las 2 fases de crecimiento evaluadas fueron aquellos aislados de las áreas inanimadas de la Unidad de Terapia Intensiva, sobre todo cuando fue evaluado con el desinfectante perteneciente a la familia QAC.

Evidentemente, la naturaleza es conservadora y selecciona las estrategias que mejoran la supervivencia de los organismos vivos. Por lo tanto, es razonable esperar que las estrategias de supervivencia existentes (tales como las que confieren resistencia a los antibióticos), puede ser utilizado en respuesta a otras moléculas tóxicas (por ejemplo, biocidas) encontrados por los microorganismos. La literatura publicada sugiere que los microorganismos han adoptado las mismas estrategias de adaptación para hacer frente a los efectos tóxicos de los antibióticos y los biocidas. Por ejemplo, los mecanismos que median la resistencia a los antibióticos (es decir, los cambios en el sitio de destino, flujo de salida, y la impermeabilidad) son las mismas estrategias utilizada para producir baja susceptibilidad a los biocidas. *P. aeruginosa*, un patógeno de importancia clínica que es intrínsecamente resistente al triclosan, sobreexpresa la bomba de eflujo responsable de la resistencia, debido a mutaciones en el gen regulador que controla la expresión de dicha bomba.

Aunque *P. aeruginosa*, había sido históricamente el patógeno Gram negativo no fermentador mayoritariamente aislado en las infecciones nosocomiales, los datos confirman el incremento en la aparición de microorganismos como *S. maltophilia* y *A. baumannii*.

El único aislado proveniente del Servicio de Neonatología también mostró ser sensible a los antibióticos ensayados. Debido al poco uso de estos antimicrobianos en esta área del hospital, por la corta edad de los pacientes, no deben tener una flora muy resistente que contengan muchos determinantes de resistencia o bajos niveles de resistencia. Por esta razón la poca presión de los antimicrobianos mantiene las poblaciones bacterianas ambientales con bajos niveles de resistencia antibiótica, sin embargo y de forma preocupante, este aislado mostró ser resistente al desinfectante de la familia de los QAC cuando fue evaluado en una dilución del 10% (1%QAC), quizás motivando a su uso extensivo en estas áreas (Tabla18).

S. maltophilia es uno de los miembros típicos de las comunidades microbianas, de distribución global y se ha reportado cada vez más relacionado a las infecciones intrahospitalarias, representando un problema grave, dada su resistencia intrínseca a los antibióticos. Existen una gran probabilidad y susceptibilidad que los pacientes recluidos en las Unidades de Cuidados Intensivos, adquieran este patógeno, que los últimos años se ha convertido en uno de los principales microorganismos causante de infecciones nosocomiales, debido a su habilidad comprobada de permanecer en el medio ambiente. Nuestro trabajo corrobora esta aseveración, ya que se encontró un porcentaje alto de aislados resistentes a los desinfectantes de uso rutinario.

Anton y colaboradores, en el año 2005 reportan como drogas de elección para el tratamiento de *S. maltophilia* a Levofloxaxina y Trimetropin-Sulfametoxazol. Los autores estudiaron cepas clínicas aisladas en la ciudad de Mérida, concluyendo que estas cepas estudiadas de *S. maltophilia*, presentaron susceptibilidad solo a los dos antibióticos evaluados también en este estudio. En la tabla 18, se muestra que solo SU3 de los 15 aislados evaluados resultó ser resistente a este antibiótico Trimetropin-Sulfametoxazol.

En Venezuela, en un estudio realizado en Cumaná para caracterizar fenotípicamente cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, y establecer un patrón de actividad *in vitro* a diferentes antimicrobianos, se identificaron fenotípicamente 24 cepas de *S. maltophilia*. Las cepas mostraron 100% de resistencia a Imipenem, cefepime, amikacina y ácido nalidíxico. Estos autores determinaron que los aislados presentaron gran homogeneidad en su perfil antimicrobiano mostrando multiresistencia a la mayoría de los antibióticos probados siendo trimetoprim-sulfametoxazol y levofloxacina los antimicrobianos más efectivos *in vitro* (Antón, 2005). Estos resultados demuestran que el trimetoprim sulfametoxazol sigue siendo altamente efectivo contra este microorganismo que es multirresistente a diversos antimicrobianos y que sigue siendo una alternativa terapéutica junto con la levofloxacina, tal como lo recomienda el CLSI.

El continuo uso de los antibióticos en los hospitales y la falta de control para su adquisición a nivel poblacional, ha conllevado a la selección de microorganismos resistentes, provocando la desaparición de aislados sensibles. Esta es la razón por la cual las bacterias que residen en los hospitales presentan un elevado patrón de resistencia a los diversos antibióticos de uso común, esto ocasiona una amenaza para la salud pública, ya que promueve la aparición de nuevas cepas bacterianas y nuevos mecanismos de acción (Guzmán, 2006). A pesar de las limitaciones relacionadas con la sensibilidad y la multirresistencia de *S. maltophilia* a los antimicrobianos, numerosos estudios presentan al trimetoprim-sulfametoxazol o cotrimoxazol como el antimicrobiano de mayor eficacia demostrada frente a la mayoría de las cepas y, por tanto, es considerado como el fármaco de elección en caso de infección por *S. maltophilia* (Senol, 2004). El principal inconveniente de trimetoprim-sulfametoxazol es que sólo ejerce un efecto bacteriostático frente a la mayoría de las cepas. Debido a su carácter bacteriostático, se ha recomendado su uso a la dosis máxima tolerada (Vartivarían y col., 1994), lo cual supone una limitación a esta opción terapéutica dada la toxicidad del componente sulfonamida de la combinación (Denton y col., 1998).

El problema de toxicidad, así como el aumento de resistencias a cotrimoxazol, supuso el empleo para el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* de otros antimicrobianos como son las nuevas fluoroquinolonas y la combinación de ticarcilina-ácido clavulánico, que en diferentes trabajos demostraron su eficacia frente a este patógeno (Korzets y col., 1997). Sin embargo, Vartivarian y colaboradores en 1994, determinaron un incremento secuencial de la resistencia de *S. maltophilia* a ciprofloxacina y ticarcilina-ácido clavulánico, debido al cambio de mentalidad en el tratamiento de los pacientes con algún tipo de cáncer, en detrimento del cotrimoxazol, lo que supuso un freno en el aumento de la resistencia a este agente.

Los microorganismos Gram negativos productores β -Lactamasas de espectro extendido representan una amenaza para los pacientes hospitalizados, dado a la capacidad de hidrolizar cefalosporina de espectro extendido, comúnmente empleadas en el tratamiento de infecciones nosocomiales. La identificación de las bacterias productoras de BLEE provee la información necesaria para su tratamiento, y además los pacientes colonizados por este tipo de microorganismos deben tener consideración especial para evitar la transferencia horizontal de dichos caracteres de resistencia. En los resultados de este estudio, en la tabla 19 se muestra que el 80% de los aislados son productores de estas β -Lactamasas. Esta resistencia de *S. maltophilia* está asociada a dos β -Lactamasas, producida por genes inducibles cromosómicos, L1 y L2 (Jenl y col., 2004). La expresión de ambas enzimas está determinada por genes que presentan una elevada heterogeneidad (Avison y col., 2002). En menor medida, también participa en la resistencia a betalactámicos la acción de sistemas de transporte activo; a este respecto, Zhang y colaboradores, en el año 2000 demostraron que en mutantes de *S. maltophilia* defectivos para betalactamasas continúa existiendo, aunque en menor nivel, resistencia a algunos betalactámicos.

Todos los resultados de este trabajo permiten sugerir que efectivamente la presencia de *S. maltophilia* en los ambientes del HCU, representa un factor de riesgo, que puede ser difícil de controlar por la resistencia a los agentes de primera línea para combatirlos, como son los desinfectantes. Dada la resistencia intrínseca natural de estas bacterias a diversos antibióticos, se recomienda rotar los productos de limpieza y desinfección a los fines de no seleccionar toda la población resistente, así como continuar con estos estudios que permitan monitorear el avance o no de la población bacteriana resistente.

9. CONCLUSIONES

- El 47% de los aislados analizados resultaron ser resistentes al desinfectante con agente activo Bromuro Lauril Dimetil Amonio al 10%.
- De los 15 aislados bacterianos evaluados, el 20% resultaron ser resistentes al desinfectante Polimetilen diurea al 5%, libre de Compuestos de Amonio Cuaternario.
- De los 3 aislados que fueron capaces de crecer con el desinfectante que tiene como agente activo Polimetilen diurea al 5%, también fueron capaces de crecer con el desinfectante con agente activo Bromuro de Lauril Dimetil Bencil Amonio.
- Para los aislados bacterianos que resultaron ser susceptibles a la acción de ambos desinfectantes, se demostró que su muerte es producto de un efecto bactericida.
- Se demostró que el tiempo utilizado es suficiente para alcanzar el efecto bactericida de algunos aislados, siendo un tiempo mayor que el recomendado por los fabricantes
- El desinfectante que resultó ser más eficaz en las pruebas realizadas, es el que está libre Compuestos de Amonio Cuaternario.
- Cuando los cultivos bacterianos fueron evaluados en la fase estacionaria de crecimiento, se evidenció una mayor resistencia a ambos desinfectantes.

- Todos los aislados bacterianos de *S. maltophila* fueron capaces de crecer en presencia de (0,5% QAC), en las dos fases de crecimiento analizadas.
- Un aislado bacteriano, resultó ser resistente al Trimetropim – Sulfametaxol, y además es resistente a QAC y a 2,5% polimetilen diurea.

10. RECOMENDACIONES

- Rotar los productos de limpieza y desinfección a los fines de evitar seleccionar la población resistente.
- Continuar con estos estudios de manera que permitan monitorear el avance o no de la población bacteriana resistente.
- Controlar las medidas de lavado y limpiezas en las diferentes áreas de los hospitales y en los instrumentos.
- Establecer un uso racional de los antibióticos.
- Educar e informar a el personal de limpieza para que se utilice las concentraciones y las dosis necesarias

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alonso A, Martinez JL.** (2000). Cloning and characterization of SmeDEF, a novel mult drug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:3079- 3086.
2. **Andrews, J., M.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* **48**: 5-16.
3. **Anonymous.** (1997). *BS EN1276*: Chemical deinfectans and antiseptics- quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical densinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas- test methods and requirements (*Phase 2, Step 1*). London; British Standars Institute.
4. **Anton, D., Aranque, Y., De Donato M., Medina B., Marcano M.** (2005). Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas malthophilia*. *Kasmera.* **2**: 109-118.
5. **Avison, M., B., Higgins, C., S., Ford, P., J., von Heldreich, C., J., Walsh, T., R., Bennett, P., M.** (2002). Differential regulation of L1 and L2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.* **49**:387-389
6. **Barchitta M., Cipresso R., Guianquita L., Romeo M., Denaro C., Pennisi C., Agodi, A** (2009). Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. *Int. J Hyg. Envirom Health.* **212**: 330-337
7. **Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J.C.; Turck, M.** (1996). Antibiotic susceptibility testing by standardized single and disk method. *Am J Clin Pathol.* **45**(4):493-496
8. **Bataillon, S., Branger, B., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A.** (2011). Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *J Hosp. Infec.* **79**: 141-146.

9. Bello, T., Rivera, I., De Waard, H. (2006). Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enf Infec Microbiol Clinica*. 5: 319-321
10. Cabrera, C., E., M.S, Gómez, R. F., Zuñiga A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med* 38: 149-158.
11. Cavaco L. M, Frimodt-Moller N., Hasman H., Guardabassi L., Nielsen L., Aarestrup F., M. (2008). Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microb Drug Resist* 14:163-9.
12. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T., T. (2001) Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:428-32.
13. Chalbaud A., Alonso G. (2008). Identificación de microorganismos potencialmente patógenos en el Hospital Universitario de Caracas. *Mem. Inst. Biol. Exp*. 5: 113-116
14. Chopra I. (1987). Microbial resistance to veterinary disinfectants and antiseptics. In: Linton AH, Hugo WB, Russell AD (eds.). *Disinfection in veterinary and farm animal practice*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd. 43-65.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. (2005). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/CLSI document M100 S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 25: 168.
16. Coello N., Guevara L., Rojas V. (2003). Microbiología General: Guía de trabajos prácticos Unidad Docente de Genética (Universidad Central de Venezuela). Caracas, Venezuela.
17. Cox, A., D., Wilkinson, S., G. (1991). Ionizing groups in lipopolysaccharides of *Pseudomonas cepacia* in relation to antibiotic resistance. *Mol Microbiol*. 5: 641-646.

18. Davies, J., G., Babb, J., R., Bradley, C., R., Ayliffe, G., A., J. (1993). Preliminary study of test methods to assess the virucidal activity of skin disinfectants using poliovirus and bacteriophages. *J Hosp Infect.* **25**: 125-131.
19. Denyer, S., P., Maillard J., Y. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* **92**(Suppl):35S–45S.
20. Denton, M., Kerr, K., G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* **11**:57-80.
21. Fass R., Barnishan J., Solomon M., and L. Ayers. (1996). In vitro Activities of Quinolonas, ð-Lactams, Tobramycin, and Trimetoprim- Sulfametoazole against Nonfermentative Gram – Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1412 – 1418
22. FDA. (1995). Bacteriological Analytical Manual (BMA). Microbiological Methods for cosmetics, Lethen Agar (modified), Lethen Broth (modified).
23. Frost L. S., Leplae R., Summers A. O., Toussaint A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
24. Galan A. L. (2003). Desarrollo de Métodos para verificar la Eficacia Fungicida de sustancias Desinfectantes. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Bcelona, España. Disponible en:
<http://tdx.cat/bitstream/handle/10803/5647/lcga1de1.pdf?sequence=1>
25. García del Portillo, F., A. G. Pisabarro, E. J. de la Rosa M., A. (1987). Modulation of cell wall synthesis by DNA replication in *Escherichia coli* during initiation of cell growth. *J. Bacteriol.* **169**:2410-2416.
26. Gilbert, P., McBain, J., A. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* **16**: 189-208.
27. Gilbert, P., Moore, L., E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol.* **99**, 703–715

28. Guimarães, M., A., Tibana, A., Nuñez, M., Netto, K. (2000). Disinfectant and antibiotics activities: a comparative analysis in brazilian hospital bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol* **31**:193-199.
29. Gutiérrez, C. A., Reyes E., Jiménez F. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria multirresistente. *Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int.* **21**: 91-94
30. Guzman, M. (2006). Caracterización de los determinantes que codifican B-lactamasas de espectro extendido en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae* del servicio autónomo Hospital Universitario Antonio Alcalá. Tesis Doctoral. Postgrado en Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
31. Hancock, R., E. (1984). Alterations in membrane permeability. *Annu Rev Microbiol.* **38**: 237-264.
32. Hengge, A., R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. *Am Soc Microbiol.* pp. 161-178
33. Hugo, W., B., Russell, A., D. (1999). Types of antimicrobial agents. In *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 3a ed. Oxford: Blackwell Science. p. 5-94.
34. Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:499-518.
35. Jehl, F., Chomarat, M., Webber, M., Gerard, A. (2004). Del antibiograma a la preinscripción. Editions Biomerieux. pp 136.
36. Korzets, A., Ori, Y., Rudnicki, C., Chagnac, A., Weinstein, T., Herman, M., Kevin, D., Gafer, U. (1997). *Xanthomonas maltophilia*--a growing problem in the haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant.* **12**:2174-2176.
37. LeChevalier, M.W., Cawthorn, C.C., Lee, R.,G. (1988). Mechanisms of bacterial survival in chlorinated water supplies. *App Environ Microbiol.* **54**: 2492-2499.

38. Levy S., B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Med*; **10** (Suppl): 122-129.
39. Levy S., B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Med*; **10** (Suppl): 122-129.
40. Levy S., B. (1998). The challenge by antibiotic resistance. *Sci Am*. **278**: 46-53.
41. Li, X., Z., Zhang, L., Poole, K. (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*.**46**:333-343.
42. Livermore D., M. (1991). Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics. *Scand J Infect Dis*. **78** (Supl.):7-16.
43. López, M., T. (2008). Estudio microbiológico de nuevas alternativas en el tratamiento de *Stenotrophomonas maltophilia*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología I. Madrid, España. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/8445/1/T30716.pdf>
44. Martró, E., Hernandez, A., Ariza, J., Dominguez, M., A., Matas, L., Argerich, M., J., Matrin, R., Ausina, V. (2003). Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptic and desinfectans. *J Hosp Infect*. **55**:39-49
45. McBain, A. J., Richard, A. H., Gilbert, P. (2002). Possible implications of biocida accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *J Ind Microbiol Biotechnol*. **29**(6):326-30.
46. McDonnell, G, Russell, D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. **12**: 147-179.
47. Medina, L., K., Valencia, L., L. (2008). Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios. Trabajo Especial de Grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia. Disponible en:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis146.pdf>

48. Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:161-181.
49. Nuñez, L., Moretton, J. (2006). Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. *Hig. Sanid. Ambient.* **6**: 197-201.
50. Ortiz, V. (2005). El hospital como núcleo de las infecciones. *VITAE Academia Biomédica Digital.*
51. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999). Microbiología. McGraw-Hill Interamericana. 4ta edición.
52. Ramos Y., Alonso G. (2011). Evaluación de la resistencia a agentes desinfectantes en bacterias aisladas de ambientes naturales. *Rev Soc. Ven. Microbiol.*, **31**(2): 130-137
53. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. (2006). In vivo biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol*, **188**: 3572-3581.
54. Reyes-Domínguez, Y., G., Contreras-Ferrat, J., Ramírez-Santos, J., Membrillo-Hernández M. C. Gómez-Eichelmann. (2003). Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* **185**:1097-1100.
55. En Prensa:Revisión en la Web:
<http://www.gefor.4t.com/bacteriologia/stenotrophomonasmaltophilia.html>.
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/esterilizacionydesinfeccion.pdf>.
http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000300009&script=sci_arttext.
<http://patentados.com/img/2010/04-descripcion/composicion-quimica-y-usos.1.png>
56. Rodríguez A., Martínez D., Paez N., Rodríguez C. (2006). Estudio de la resistencia de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales ante soluciones en uso. *Rev Mex Patol Clin.* **53**: 119-122.

57. Russell A., D. (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol*; **82**: 155-165.
58. Russell A., D., Maillard J., Y., Furr J., R. (1998). Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:2151.
59. Russell A., D. (2001). Mechanism of bacterial insusceptibility to biocides. *J Infect Control.* **29**:259-61.
60. Russell A., D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistance bacteria. *J Appl Microbiol*; **92 (Suppl)**: 121-135.
61. Rusell, A., D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and enviromental situations. *Lancet Infect. Dis.* **3**: 794-802
62. Rutala W., A. (2000). APIC guideline for selection and use of disinfectants. *Am. J Infect. Control* **23**: 313-343.
63. Salton, M., R., J. (1968). Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability. *J. Gen. Physiol.* **52**: 252S-277S.
64. Senol, E. (2004). *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *J Hosp Infect.* **57**:1-7.
65. Sheldon A. (2005). Antiseptic «resistance»: real or perceived threat? *Clin. Infect. Dis.* **40**: 1650-1656.
66. Sutton L, Jacoby GA. (1978). Plasmid-determined resistance to hexachlorophene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; **13**: 634-636.
67. Tafur, J., T., Torres, J., A., Villegas, M., V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, **12**: 223-233
68. Tunçay M. E., Meral Ö., Nedim S. , PhD, Deniz Gür , PhD. (2003). An investigation of the bactericidal effect of certain antiseptics and disinfectants on some hospital isolates of Gram-negative bacteria. *Infect. Control Hosp Epidemiol.* **24**: 225-227.

69. Thomson K., S, Smith M., E. (2000). The new beta-lactamases of gramnegative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect* 2: 1225-1235.
70. Vartivarian S, Anaissie E, Bodey G, Sprigg H, Rolston K. (1994). A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:624-627.
71. Vila J., Marti S., Sanchez C., J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.*; 59:1210-5.
72. Vives, E. A., Posse, V., Oyarvide, M. L. G., Pérez, M., Medvedovsky D., Rothlin R. (2004). Antisépticos y desinfectantes. Disponible en:
<http://ulceras.net/publicaciones/Antisepticosydesinfectantes.pdf>
73. Zhang, L., Li, X., Z., Poole, K. (2000). Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:287-293.