



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“ESTUDIO DEL EFECTO INHIBITORIO DE UNA
SOLUCIÓN ELECTROLIZADA DE SUPEROXIDACIÓN
CON pH NEUTRO EN BACTERIAS.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER ÉL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ ÁNGEL REYES GARCÉS

ASESOR:

M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Estudio del efecto inhibitorio de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro en bacterias.

Que presenta el pasante: José Ángel Reyes Garcés

Con número de cuenta: 303127873 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 28 de octubre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	M.C. María Guadalupe Aviles Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. María Guadalupe Hernández Torres	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do SUPLENTE	M.C. Víctor Hugo Ábrego Reyes	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la oportunidad de vivir y siempre estar a mi lado, cuidándome y orientándome en todos los momentos buenos y malos de la vida. Mil Gracias.....

*A mi MAMA Hilda Garcés Reyes, por darme la vida, por todo su gran amor que me ha dado, por darme una educación y enseñarme a ser valiente ante las dificultades que se presentan en la vida, por tener los brazos abiertos y una palabra de aliento, por tu llanto y tus desvelos, por tantos días de consuelo, por aceptar mis errores sin tener reproches, por estar día tras día con tu sonrisa tras esa ventana viendo mi partida y con la misma energía esperando mi regreso, por tu entrega infinita sin esperar nada a cambio, eres el ángel maravilloso que me da paz y sabiduría y porque todo lo que soy es gracias a ti MAMA, eres una gran mujer, **TE QUIERO Y TE AMO.....Gracias MAMI***

*A mis tíos Juan y Javier Garcés Reyes, por todo su apoyo incondicional que me dieron durante toda mi carrera, gracias por el gran amor sincero, el esfuerzo, y dedicación que me han brindado en todos los años de mi vida y porque todo lo que soy es gracias a ustedes, gracias por creer en mí, los **Quiero Mucho.....***

*A mi novia Jessica Reyes Ayala, gracias por llegar a mi vida, por entrar en mi mundo, por tu amor sincero, por tu gran paciencia, el apoyo e inspiración que me brindaste, gracias por apoyarme durante esta etapa, por estar en los buenos y malos momentos de mi vida, y sobre todo hacer mi camino menos difícil y regalarme la oportunidad de aprender tantas cosas juntos.....**TE AMO OSA***

A mis tíos René y Yolanda, por todos sus consejos, anécdotas, por todo el cariño que me demostraron y su gran apoyo incondicional, los quiero mucho, Dios los cuide y los bendiga hoy y siempre.

A mis tíos Daniel e Isabel, por sus consejos y apoyo incondicional que me demostraron, gracias por estar siempre al pendiente de mis avances y su sincera preocupación, los quiero mucho, que Dios los cuide y los bendiga siempre.

*Gracias a todos y cada uno de los que integran esta gran **Familia Garcés Reyes**, por apoyarme a lo largo de estos años, por su cariño y comprensión. Cada uno sabe cuánto los quiero y aprecio, por tal motivo únicamente quedaron en mi mente y en mi corazón. **Gracias Gran Familia.....***

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por formar parte de su privilegiado grupo de estudiantes, por ser la máxima casa de estudios y mi segundo hogar durante varios años, por darme una formación académica y por darme la oportunidad de llevar en el corazón el orgullo de ser Universitario.

A mi asesor M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez por aceptarme y darme este proyecto, por permitirme trabajar a su lado, gracias Profe. por ser más que un asesor, por sus buenos consejos, su apoyo, sus conocimientos, enseñanzas, paciencia, atención y sobre todo por su gran amistad.

Mil Gracias Profe.

Al profesor M.V.Z. David Páez Esquiliano por darme esta oportunidad de trabajar a su lado, gracias por su apoyo incondicional, por estar al pendiente de mis avances así como haberme brindado su amistad. Gracias.

A la M. En C. Sofía González Gallardo, gracias por su apoyo, dedicación, paciencia y tiempo brindado en este proyecto.

A todos y cada uno de los profesores que integran la universidad, gracias por formar parte en nuestro crecimiento y desarrollo profesional.

DEDICATORIAS

A la memoria.....

Mis Abuelos Lucio Garcés Nájera y Ángela Reyes Espinoza.

A mi primos Lurdes Garcés Toribio y Jaime Israel Garcés.

A mis tíos Luis Garcés Nájera y Dolores Garcés Nájera.

Y a cada uno de los integrantes de mi familia que desgraciadamente se nos adelantaron.

Gracias por todas sus bendiciones que nos brindad desde el cielo, gracias por ser nuestros guías y cuidarnos por toda el camino de nuestra vida.

INDICE GENERAL

Índice de general.....	I
Índice de figuras	III
Índice de fotos	IV
Índice de tablas	VI
Índice graficas	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Resumen	IX
1. Introducción.....	1
1.1Definiciones.....	2
1.2 Generalidades	3
1.2.1 Principales Condiciones que debe reunir un Desinfectante	3
1.2.2 Factores que Influyen en la Desinfeccion.....	5
1.2.3 Niveles de Desinfección	6
1.2.4 Clasificacion de Spaulding	7
1.3 Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes.....	8
1.4 Clasificación de los desinfectantes.....	9
1.5 Soluciones electrolizadas	10
1.5.1 Producción	11
1.5.2 Mecanismo de Acción	12
2. Objetivo general	13
2.1 Objetivos particulares	13
3. Justificación.....	14
4. Hipótesis.....	15

5. Materiales.....	16
5.1 Material.....	16
5.2 Material Biológico	16
5.3 Medios de Cultivo	16
5.4 Equipos	17
5.5 Soluciones.....	17
5.6 Reactivos.....	17
6 Metodología.....	18
6.1 Obtención de cepas	18
6.2 Corroboración de las Cepas.....	18
6.3 Ensayos de la SES concentrada a distintos tiempos	19
6.4 Ensayos de la SES a distintas diluciones y tiempos	19
6.5 Ensayos SES concentrada a distintas temperaturas y tiempos	19
6.6 Técnica del Coeficiente Fenólico.....	20
6.7 Dilución en Placa.....	22
7. Resultados	23
7.1 Identificación de las bacterias	23
7.2 Diluciones de la SES a diferentes tiempos.....	27
7.3 Temperatura de la SES a diferentes tiempos.....	29
7.4 Coeficiente Fenólico.....	31
7.5 Técnica Colorimétrica de Mosmann	34
7.6 Microfotografías electrónicas de <i>Streptococcus faecalis</i>	37
8. Discusión de Resultados	38
9 Conclusiones.....	42
10. Bibliografía	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la producción de SES	11
Figura 2. Representación esquemática de la membrana celular bacteriana ...	12
Figura 3. Vitek 2	18

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Resultado <i>Staphylococcus aureus</i> y SES de 60 ppm.....	28
Foto 2. Resultado <i>St. faecalis</i> y SES de 60 ppm	28
Foto 3. Resultado <i>E. coli</i> y SES de 60 ppm.....	28
Foto 4. Resultado <i>P. aeruginosa</i> y SES de 60 ppm.....	28
Foto 5. Resultado <i>Staphylococcus aureus</i> y SES de 60 ppm a 37 ° C	29
Foto 6. Resultado <i>St. faecalis</i> y SES de 60 ppm a 37 ° C	29
Foto 7. Resultado <i>E. coli</i> y SES de 60 ppm a 37 ° C	29
Foto 8. Resultado <i>P. aeruginosa</i> y SES de 60 ppm a 37 ° C.....	29
Foto 9. Resultado <i>Staphylococcus aureus</i> y SES de 60 ppm a 5 ° C	30
Foto 10. Resultado <i>St. faecalis</i> y SES de 60 ppm a 5 ° C	30
Foto 11. Resultado <i>E. coli</i> y SES de 60 ppm a 5 ° C	30
Foto 12. Resultado <i>P. aeruginosa</i> y SES de 60 ppm a 5 ° C.....	30
Foto 13. Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y <i>S. aureus</i>	32
Foto 14. Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y <i>S. aureus</i>	32
Foto 15. Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y <i>S. aureus</i>	32
Foto 16. Ensayo de coeficiente fenólico y <i>S. aureus</i>	33
Foto 17. Ensayo de coeficiente fenólico y <i>S. aureus</i>	33
Foto 18. Ensayo de coeficiente fenólico y <i>S. aureus</i>	33
Foto 19. Efecto de la SES en <i>Staphylococcus aureus</i> evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min	34
Foto 20. Efecto de la SES en <i>Staphylococcus aureus</i> evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min.....	34
Foto 21. Efecto de la SES en <i>Escherichia coli</i> evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min	35

Foto 22. Efecto de la SES en <i>Escherichia coli</i> evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min.....	35
Foto 23. Efecto de la SES en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min	36
Foto 24. Efecto de la SES en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min.....	36
Foto 25. Microfotografía Electrónica de Transmisión a 15000 aumentos, <i>Streptococcus faecalis</i> , tratado con SSF estéril.....	37
Foto 26. Microfotografía Electrónica de Transmisión a 15000 aumentos, <i>Streptococcus faecalis</i> , tratado con SES de 60 ppm	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación General de los Desinfectantes	9
Tabla 2. Técnica usada para la realización de las diluciones de la SES	20
Tabla 3. Técnica usada para la realización de las diluciones del Fenol.....	21
Tabla 4. Resultados de SES a diferentes concentraciones y tiempos con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tabla 5. Resultados de la SES concentrado a diferentes temperaturas (25, 37 y 5°C) y tiempos con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Tabla 6. Resultados del índice fenólico de la SES con <i>S. aureus</i> a diferentes tiempos.....	31

INDICE DE GRAFICAS

Grafico No. 1 Determinación de la MIC, de la SES en <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones.....	34
Grafico No. 2 Determinación de la MIC, de la SES en <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones	35
Gráfico No. 3 Determinación de la MIC, de la SES en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a diferentes concentraciones.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitro
μm	Micrómetro
Abs	Absorbancia
AOAC	Association of Official Analytical Chemists International
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
EMB	Eosina Azul de Metileno
g	Gramo
h	Hora
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
MTT	3- (4,5 – dimetiltiazol – 2 y 1) – 2,5 – dimetiltetrazolio
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetro
°C	Grado Celsius
ppm	Partes por Millón
seg	Segundo
SES	Solución Electrolizada de Superoxidación con pH Neutro
SSF	Solución Salina Fisiológica
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril

RESUMEN

Muchos desinfectantes y técnicas han sido inspirados por prácticas empíricas de higiene personal, tales como hervir el agua, el uso de colorantes o la exposición a los rayos del sol. Es por ello que la desinfección se considera un procedimiento, que es utilizado como elemento de ruptura de la cadena de transmisión de microorganismos, evitando posibles contaminaciones a nivel de laboratorio, hospital, industria, etc.

Una gran variedad de agentes desinfectantes se han utilizado para destruir a los microorganismos desde hace décadas y difieren grandemente en sus propiedades como su grado de toxicidad, estabilidad, espectro de inhibición, compatibilidad, olor, efecto residual, etc. Por tal motivo las Soluciones Electrolizadas han sido una alternativa en el campo de la desinfección desde hace aproximadamente tres décadas, lamentablemente su estabilidad no iba más allá de las 24 horas. Debido a esto se le dio la continuidad a las investigaciones sobre el desarrollo de dichas soluciones, ya que presentan propiedades atóxicas para el humano. A partir de 1996 fueron descritas como Soluciones Electrolizadas de Superoxidación (SES) de pH neutro por Tanaka, confiriéndoles ya no solo su alta capacidad desinfectante, sino además un pH de 6.4 – 7.5, lo que las acerca a la neutralidad, una estabilidad aproximada de 18 meses bajo condiciones ambientales normales y una completa atoxicidad. Hasta el momento no existe evidencia científica publicada en medios arbitrados de su sitio de acción, pero sin embargo describen el posible efecto que puede ejercer en las bacterias.

Por todo lo anterior descrito en este trabajo se determino el efecto bactericida de la SES en bacterias que comúnmente tienen alto grado de resistencia y de importancia clínica. Los microorganismos utilizados fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en donde fueron sometidas a un sistema automatizado de identificación bacteriana (Vitek 2).

Para determinar el efecto bactericida a diferente concentración y tiempo, se realizaron diluciones dobles seriadas, inoculando directamente la bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland con ayuda del equipo DensiCHEK plus, encontrando que después de 10 minutos de exposición la SES inhibe el crecimiento bacteriano a una dilución no mayor de 1:4. Por otro lado de igual forma se determino si existen diferencias al disminuir o incrementar la temperatura, observando que ésta inhibe mejor a una temperatura de 25 y 37°C. Con respecto al coeficiente fenólico se encontró que a una concentración del 14% ejerce el efecto bactericida. Para realizar los ensayos en microplaca se emplearon diluciones dobles seriadas aplicando el método colorimétrico de Mosmann exponiendo la bacteria con la SES, encontrando que ésta inhibe a una dilución no mayor de 1:4 en un tiempo promedio de 10 minutos. Posteriormente se hicieron observaciones en el MET evidenciando el daño sobre la bacteria, comprobando lo que estipulan algunos artículos de manera teórica.

1. INTRODUCCIÓN.

Muchos desinfectantes y técnicas de desinfección han sido inspirados por prácticas empíricas de higiene personal, tales como el agua hervida, el uso de colorantes o la exposición a los rayos del sol. En tiempos remotos se pensaba que los demonios y espíritus malignos eran la causa de las infecciones.

El arte y la ciencia de la desinfección precedieron, sin duda, a la teoría infecciosa de la enfermedad. En un principio se observó que ciertos compuestos, cuando se aplicaban sobre cadáveres en descomposición o se agregaban a las aguas residuales, atenuaban la emanación de malos olores. Sobre tales bases empíricas, el uso de los desinfectantes y su aplicación en la desinfección se fue desarrollando hasta configurar una ciencia de considerable magnitud.⁷

Desde un punto de vista histórico, la desinfección por agentes químicos fue utilizada por múltiples procedimientos. Por ejemplo los egipcios 3000 años a. C. utilizaban el vino de palma y el vinagre para rociar las cavidades abdominales de los cuerpos (humanos y animales) que embalsamaban.⁸ Pero la más antigua referencia de una desinfección es descrita en la Odisea, 800 años a. C. en la que Ulises, después de haber matado a sus rivales ordena que se quemara azufre adentro de las casas. De igual manera en Europa, durante las epidemias de peste humana en plena edad media, fue recomendado el azufre para desinfectar los locales y los objetos contaminados.⁴³

Para 1676, Van Leeuwenhoek aportó la primera demostración científica de la acción desinfectante de soluciones ácidas que él verificaba en sus "animálculos" que describió, recuperando las bacterias recogidas de la superficie de sus dientes con vinagre de vino, las cuales dejaban de moverse.⁸ En 1745 nuevamente en Europa, fue prescrita la utilización de sosa caústica (álcalis) para la limpieza de los recipientes que habían servido para alimentar animales afectados por la peste bovina y el tratamiento con lechada de cal de las maderas y las paredes de los establos. Incluso, los objetos que habían tenido contacto con los perros rabiosos, eran limpiados con agua jabonosa no

diluida vertiéndola en grandes cantidades sobre los restos de saliva del animal rabioso.⁴³

1.1 Definiciones

Antiséptico: Agente que inhibe o destruye microorganismos sobre tejido vivo, incluyendo la piel, cavidades orales y heridas abiertas.^{9, 38}

Sanitizante: Agente que reduce, en superficies inanimadas, la cantidad de toda forma de vida microbiana, incluyendo hongos, virus y bacterias.^{9, 24}

Esporicida: Agente que destruye esporas fúngicas y bacterianas cuando se usan en una concentración suficiente durante un tiempo de contacto específico. Se espera que mate todo microorganismo vegetativo.^{38, 42}

Limpieza: Remoción mecánica de toda materia extraña en superficies de objetos inanimados. Se consigue en general con la utilización de agua y detergente. El propósito de la limpieza es disminuir el número de microorganismos a través de arrastre mecánico y no asegura la destrucción de éstos.^{9, 24, 38}

Descontaminación: Es la Eliminación de microorganismos de objetos dejándolos seguros para la manipulación. El término se aplica a objetos contaminados durante la atención de pacientes, por contacto con fluidos corporales o restos orgánicos. La manipulación de estos objetos puede resultar con riesgos para el operador y requieren una disminución de la carga microbiana previo a su desinfección o esterilización.^{9, 24}

Desinfección: método químico o físico de eliminación de todos los microorganismos patógenos con excepción de las esporas, alterando su estructura o su metabolismo, independientemente de su estado fisiológico.^{9,24}

Esterilización: proceso de destrucción o eliminación completa de cualquier tipo de vida microbiana, incluyendo las formas esporuladas de hongos y bacterias.

Significa el nivel más alto de seguridad y, por tanto, de letalidad (o eficacia biocida).^{9, 24, 38, 42}

1.2 Generalidades

La desinfección consiste en una técnica de saneamiento cuyo objetivo es destruir los microorganismos patógenos, es decir productores de enfermedades, estos pueden actuar sobre animales, superficies, objetos o ambiente, para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas. Esta acción destructora o inhibidora es en función del tipo de microorganismo, puede ser:

- ✓ bactericida, se destruyen bacterias.
- ✓ fungicida, se destruyen hongos.
- ✓ viricida, se destruyen virus.
- ✓ esporicida, se destruyen esporas.

1.2.1 Principales Condiciones que debe reunir un Desinfectante

Un desinfectante según la Food and Drug Administration (FDA), es una sustancia que, depositada sobre un material, vivo o inerte, destruye en 10 o 15 minutos todos los microorganismos patógenos, alterando lo menos posible el sustrato donde residen y abarcando todas las formas vegetativas de bacterias, hongos y virus (excepto el virus de la Hepatitis B, lo que significa ausencia de poder de inactivación, sino que se requiere comprobar su eliminación para ser considerado desinfectante). Actualmente, se denomina bactericida a los productos que actúan tanto in vivo como sobre material inerte y se reserva el término desinfectante para los productos que sólo actúan sobre material inerte.

^{24, 34}

Las características que debe reunir un buen desinfectante son:

- ✓ **Amplio Espectro.** - Debe tener un amplio espectro antimicrobiano y efectivo frente a virus, células vegetativas y esporas de bacterias y hongos.

- ✓ **Rápida Acción.** - Debe producir una rápida muerte a los microorganismos.
- ✓ **No ser afectado por factores del medio ambiente.**- Debe ser activo en presencia de materia orgánica (sangre, esputo, heces) y compatible con detergentes, jabones y otros agentes químicos en uso.
- ✓ **No Tóxico.**- No debe ser irritante para el usuario ni para el paciente. Aunque hasta la fecha todavía no se logró, pero con el avance de la ciencia y tecnología se encuentra en curso.
- ✓ **Compatible** con las superficies.- No debe corroer metales ni deteriorar plásticos, gomas, etc.
- ✓ **Sin Olor.**- Debe tener un olor suave o ser inodoro.
- ✓ **Económico.**- El costo se debe evaluar en relación con la dilución, el rendimiento y la seguridad.
- ✓ **Estable.** - En su concentración y dilución en uso. El glutaraldehído al ser activado varía pH de 7.5 a 8.
- ✓ **Limpieza.**- Debe tener buenas propiedades de limpieza.
- ✓ **Fácil de Usar.**- La complejidad en la preparación, concentraciones, diluciones y tiempo de exposición del producto pueden crear confusión en el usuario.
- ✓ **Efecto residual no tóxico sobre las superficies.**- Muchos desinfectantes tienen acción residual sobre las superficies, pero el contacto de las mismas con humanos puede provocar irritación de piel, mucosas u otros efectos no deseables.

- ✓ **Soluble en Agua.-** Para lograr un descarte del producto no tóxico o nocivo para el medio ambiente.

1.2.2 Factores que Influyen en la Desinfección

- Concentración del agente y tiempo de actuación. ^{24, 25, 44}
- El pH afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de 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 ácidos.
 - ✓ Los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos. ^{24, 25, 44}
- Temperatura. Normalmente al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes la subida de 10 grados supone duplicar la tasa de muerte. ^{24, 25, 44}
- Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana:
 - ✓ Según la especie empleada: p. ej., el bacilo tuberculoso resiste los hipocloritos mejor que otras bacterias
 - ✓ Según la fase de cultivo.
 - ✓ Dependiendo de la presencia de cápsulas o de esporas (suelen conferir más resistencia).
 - ✓ Dependiendo del número de microorganismos iniciales. ^{24, 25, 44}
- Presencia de materiales extraños: La existencia de materia orgánica en el material a tratar (p. ej., sangre, suero, pus, etc.) afecta negativamente a la potencia, hasta el punto que pueden llegar a inactivarlos, en cuanto a su poder desinfectante o esterilizante. ^{24, 25, 44}

1.2.3 Niveles de Desinfección

Dependiendo de la capacidad del agente para destruir microorganismos se define en tres niveles de desinfección: alto, intermedio y bajo.¹

Desinfección de Alto Nivel: Proceso por medio del cual se elimina todos los microorganismos, incluyendo esporas, virus lipofílicos, hidrofílicos y *M. tuberculosis*. Se utilizan sobre aquellos materiales en contacto con mucosas integrales, ya sea estériles (cistoscopios, catéteres de colangiografía retrograda) o con microorganismos (broncoscopios duodenoscopios, colonoscopios, tubos endotraqueales, circuitos respiratorios de anestesia, etc.).^{9, 24, 34}

Desinfección de Nivel Intermedio: proceso por medio del cual se eliminan formas vegetativas de bacterias, incluyendo *M. tuberculosis*, hongos y virus. Pero no necesariamente las esporas bacterianas. Suelen denominarse tuberculicidas. Algunos agentes son: compuestos clorados (por ejemplo: hipoclorito de sodio), iodados (iodoforos y alcohol iodado), fenólicos, alcoholes, clorhexidina.^{9, 24, 34}

Desinfección de Bajo Nivel: proceso por medio del cual se elimina la mayoría de las bacterias, algunos virus y algunos hongos, pero no necesariamente microorganismos resistentes como el bacilo de la tuberculosis o esporas bacterianas, por ejemplo; compuestos de amonios cuaternario y mercuriales.^{9, 24, 34}

1.2.4 Clasificación de Spaulding

En 1968, Earl Spaulding estableció el primer criterio para la desinfección con el objetivo de racionalizar las indicaciones del procesamiento de los materiales y del instrumental. Spaulding considero el grado de riesgo de infección que existe con el empleo de estos artículos y los clasifico de la siguiente manera:^{9, 24, 39}

Áreas Críticas: son áreas donde se efectúan procedimientos invasivos a los pacientes que por su condición están expuestos a contraer una infección, y donde se lava material contaminado, por lo que deben ser siempre estériles. Entre estas áreas pueden citarse: quirófanos, salas de endoscopia, unidades de cuidado intensivo, unidades de quemados, entre otras.

Áreas Semi-Criticas: en estas áreas los pacientes pueden permanecer largos periodos o de manera transitoria. Durante su estancia puede tener contacto con elementos y mobiliario por medio de la piel intacta. Incluye salas de hospitalización, consultorios de urgencias, los cuartos de observación, etc. Es aconsejable una desinfección de alto nivel, siempre posterior a un cuidadoso lavado con agua y detergente.

Áreas No Críticas o Generales: allí las personas están de paso y no tienen contacto directo con los elementos hospitalarios. Entre dichas áreas pueden situarse los consultorios médicos, las salas de espera, los depósitos de medicamentos, los servicios sanitarios, los ascensores, las salas de fisioterapia y las centrales de enfermería, entre otras. Se encuentra en contacto con la piel sana pero no con las mucosas. En condiciones normales poseen poca posibilidad de producir infecciones. Sin embargo, pueden funcionar como “vectores mecánicos” transfieren gérmenes de un paciente a otro, lo que favorece la aparición de infecciones cruzadas, más graves en el caso de pacientes inmunodeprimidos.

1.3 Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes

Los desinfectantes intervienen en algunas etapas de la vida microbiana. Los mecanismos de acción son complejos, pueden ejercer principalmente sobre una función, comprometiéndose luego otra, algunas veces reversibles y otras irreversibles. Dentro de los principales se encuentran: ^{24, 34, 44}

- Daño de la pared celular, llevando a los microorganismos a la lisis.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, impidiendo el transporte selectivo de nutrientes al interior de la célula bacteriana.
- Alteración de la naturaleza coloidal del citoplasma, desnaturalizándola o coagulándola.
- Inhibición de la acción enzimática.
- Formación de antimetabolitos.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

1.4 Clasificación de los desinfectantes

Todos los días usamos agentes químicos para controlar o eliminar el crecimiento microbiano: detergentes y jabones para el cuerpo y la ropa, cloración de las aguas potables, antisépticos para la piel y el tratamiento de heridas, desinfectantes para tratar superficies en la industria y laboratorios.^{3, 4, 9}

Tabla No.1 Clasificación General de los Desinfectantes. ^{12-14, 17, 22, 27- 29, 35, 36, 41}

Entidad Química	Clasificación	Ejemplo
Aldehídos Alcoholes	Agente Esporicida Desinfectante de uso general, antiséptico y agente antiviral.	Formaldehido 36.5% Glutaraldehído al 2% Alcohol ➤ Isopropílico al 70% ➤ Etanol al 70%
Cloro e hipoclorito de sodio	Agente esporicida.	Hipoclorito de sodio al 0.5%.
Fenoles	Desinfectante de uso general.	500 µg por g de clorocresol, 500 µg por gramo de cloroxilenol.
Ozono	Agente esporicida.	8% de gas en peso.
Peróxido de hidrógeno	Esterilizante de fase de vapor, agente esporicida líquido, antiséptico.	4 µg por g de H ₂ O ₂ vapor, solución del 10% al 25%, solución al 3%.
Diguanidas sustituidas	Agente antiséptico.	Gluconato de clorhexidina al 0.5%.
Acido peracético	Esterilizante líquido, esterilizante de fase vapor.	Ácido peracético al 0.2%, 1 µg por g ácido peracético.
Óxido de etileno	Esterilizante de fase de vapor.	600 µg por g Óxido de etileno.
Compuestos de amonio cuaternario	Desinfectante de uso general y antiséptico.	200 µg por g cloruro de benzalconio.
β-Propiolactona	Agente esporicida.	100 µg por g β-Propiolactona

1.5 SOLUCIONES ELECTROLIZADAS

Las soluciones electrolizadas han sido una alternativa en el campo de la desinfección desde hace aproximadamente tres décadas, lamentablemente tenía características físico – químicas que las hacían una opción sumamente inapropiada debido a su pH, el cual era ácido o alcalino; su estabilidad no iba más allá de las 24 horas y su toxicidad era alta.

Debido a todos estos inconvenientes, su campo de aplicación se vio limitado a la desinfección de algunas aéreas, pero a pesar de tales desventajas poseían una elevada capacidad desinfectante e incluso son catalogadas como desinfectantes de alto nivel, motivo por el cual se le dio la continuidad a las investigaciones sobre el desarrollo de dichas soluciones.

A partir de 1996 fueron descritas como soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) de pH neutro por Tanaka, confiriéndoles ya no solo su alta capacidad desinfectante, sino además un pH de 6.4 – 7.5, lo que las acerca a la neutralidad, una estabilidad aproximada de 18 meses bajo condiciones ambientales normales y una completa atoxicidad.

Dichas soluciones han demostrado ser efectivas en el manejo de diversas heridas así como la desinfección de áreas o instrumental quirúrgico. Su espectro microbicida es amplio y efectivo contra gran variedad de bacterias, hongos, virus y micobacterias, eliminándolos de manera rápida. Además el uso clínico de estas soluciones ha demostrado su eficacia y seguridad así como su potencia al mantener los tejidos libres de infección, pero también se ha sugerido que algunas de éstas pueden tener un efecto sinérgico relacionado con la modulación de procesos inflamatorios y de cicatrización.^{21, 26, 45}

1.5.1 Producción

Es un proceso sencillo, ya que son desarrolladas a partir de agua común y sal (NaCl). A nivel industrial, en este caso el agua de la llave es purificada a través de osmosis inversa añadiéndole una solución saturada de cloruro de sodio grado reactivo, sometiéndola a un proceso de electrolisis controlada (parámetros estrictos de voltaje y carga de corriente) para la generación de iones, que son posteriormente ordenados por medio de un proceso de electro-diálisis bipolar, y se seleccionan a través de un proceso de electro-diálisis inducido (selectividad iónica) con el que se consiguen iones controlados y estables. Al final de este proceso se realiza una concentración controlada de volúmenes obteniendo la neutralidad del pH. La ventaja de estos procesos es que resulta una solución con un pH neutro de 6.4 a 7.5, una estabilidad mayor ante condiciones ambientales con rangos de iones dentro de estándares conocidos y permitidos.^{2, 18}

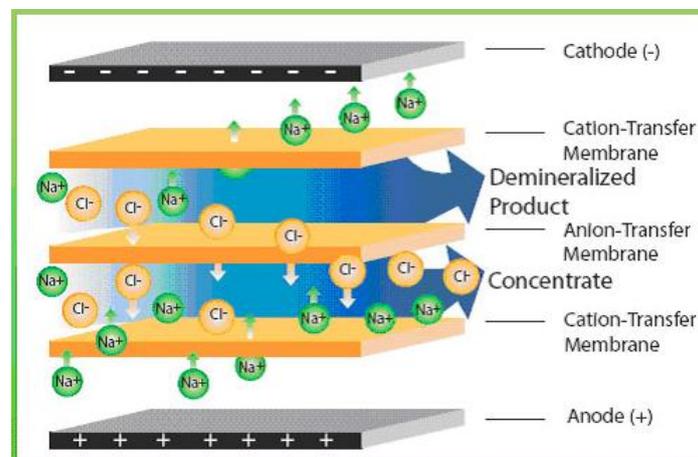


Figura 1. Esquema representativo de la producción de SES, a través de carga eléctrica y membranas de transferencia.

1.5.2 Mecanismo de Acción

Las SES tiene efecto de oxidación de los grupos sulfidrilo (-SH) y aminoácidos de la pared y la membrana bacteriana provocando el rompimiento, afectando el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios, inhibición en la síntesis de proteínas, alteración en la energía (adenosin fosfato), rompimiento de las cadenas de RNA y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular.^{6, 10, 30}

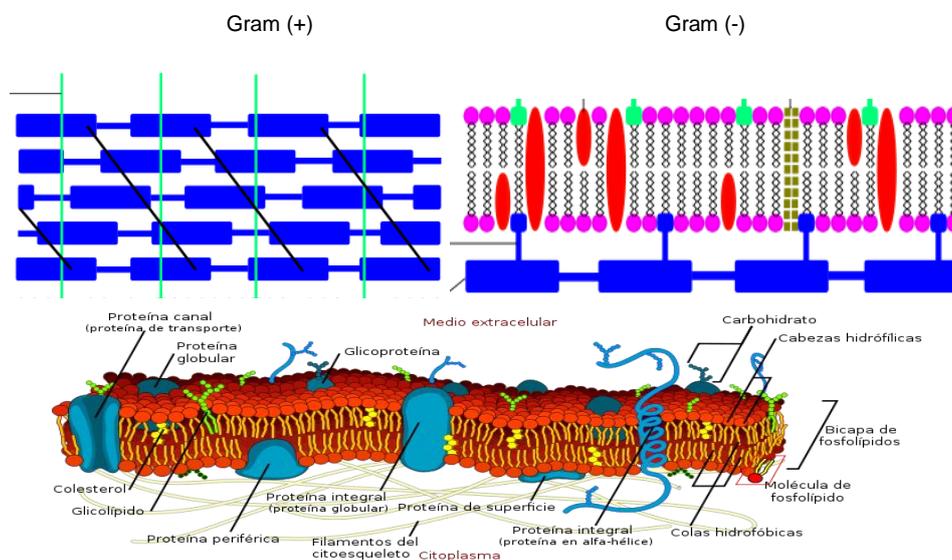


Figura 2. Representación esquemática de la membrana celular bacteriana y la pared de Gram (+) a la izquierda y Gram (-) a la derecha, nótese la diferencia en el espesor del péptidoglicano (color azul) en ambas bacterias, además de membrana externa en la Gram (-).

2. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto bactericida de la solución electrolizada de superoxidación (SES) con pH neutro, utilizando las siguientes variables concentración, temperatura, tiempo de exposición en contra de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aprender el funcionamiento de un sistema automatizado (Vitek 2) de identificación bacteriana utilizando las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Realizar ensayos SES - bacteria a diversas concentraciones de la solución.
- Determinar el efecto inhibitorio de la SES utilizando distintos tiempos de exposición.
- Evidenciar si a distintas temperaturas (ambiente, 37° C y 4°C) existe diferencia en el efecto de la SES.
- Determinar la dilución adecuada de uso de la SES utilizando la técnica del coeficiente fenólico.
- Emplear el método de Mosmann para evidenciar el efecto bactericida de SES en las bacterias antes mencionadas.
- Evidenciar por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) los probables cambios estructurales producidos por la SES.

3. JUSTIFICACION.

Actualmente la desinfección se considera un proceso utilizado como elemento de prevención en hogares, hospitales, laboratorios, industria farmacéutica y alimenticia, interviniendo como elemento de ruptura o barrera de la cadena de transmisión de los agentes biológicos.

Los desinfectantes químicos en general han sido de los más usados hace décadas, pero actualmente se ha investigado y encontrado que algunos presentan alta toxicidad, sin embargo su efectividad no es cuestionable.

Por este motivo las soluciones electrolizadas han sido una alternativa en el campo de la desinfección desde hace aproximadamente tres décadas, pero lamentablemente su estabilidad no iba más allá de las 24 horas. Debido a esto se le dio la continuidad a las investigaciones sobre el desarrollo de dichas soluciones, ya que presentan propiedades atóxicas para el humano.

Es por ello que el trabajo se enfoca en evaluar la eficacia bactericida, determinando la dilución adecuada, tiempos de exposición necesarios y temperatura ideal para realizar la desinfección con dicha solución, ya que puede ser un producto innovador y competitivo en el mercado de los desinfectantes.

Tomando como referencia Normas Mexicanas (NMX – BB – 040 – SCFI – 1999) y métodos internacionales (AOAC, 2000), que en todos los casos evalúan por conteo colonial de manera visible o por turbidez y/o nitidez siendo esta una lectura cuestionable.

Por tal razón estamos proponiendo la implementación del método de Mossman el cual utiliza una lectura espectrofotométrica, mucho más exacta. Por lo tanto la mejora en lectura hace la técnica más confiable y precisa.

4. HIPOTESIS.

Si la Solución de Superoxidación con pH Neutro a diferentes concentraciones, tiempo, temperatura y en cuatro bacterias diferentes, tiene efecto bactericida, entonces compite y supera a otros desinfectantes por sus cualidades atóxicas.

5. MATERIALES.

5.1 Material

- Mechero Bunsen
- Asas Bacteriológicas
- Portaobjetos
- Espátula
- Balanza granataría
- Gradilla
- Matraz Erlen Meyer de 250, 500 y 1000ml (KIMAX®)
- Probeta graduada de 250 y 500 ml (KIMAX®)
- Escala según Mc Farland
- Tubos de ensaye con tapón de rosca estériles de 13 x 100 (PYREX®)
- Pipetas graduadas desechables estériles de 5 y 10 ml
- Micropipeta de 100µl (BIOHIT Proline®)
- Micropipeta Multicanal de 10 – 300µl (BIOHIT Proline®)
- Puntas amarillas para micropipeta estériles
- Cajas Petri estériles desechables (S y M Laboratorios®)
- Placas de Cultivo Celular de 96 pocillos fondo plano con tapa (MICROTEST™)

5.2 Material Biológico

- Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

5.3 Medios de Cultivo

- Agar Sales Manitol (BIOXON)
- Agar Sangre (BIOXON)
- EMB (BIOXON)
- Cetrimida (BIOXON)
- Agar – Agar purificado y exento de inhibidores (DIBICO)
- Caldo Cerebro Corazón según Rosenow (BIOXON)

5.4 Equipos

- Autoclave
- Microscopio óptico (ZEISS modelo Axion Lab A1)
- Estufa bacteriológica (RIOSSA)
- Refrigerador (Pfizer)
- Campana de Flujo Laminar Vertical y Horizontal (ORGOS)
- Previ Color Gram (BIOMERIERUX)
- Vitek 2 (BIOMERIERUX)
- DensiCHEK plus (BIOMERIERUX)

5.5 Soluciones

- Agua destilada
- Solución Salina Fisiológica Estéril (.85%)
- Solución Electrolizada de Superoxidación con pH Neutro de 60 ppm de HClO^-

5.6 Reactivos

- Cristal violeta (bioMérieux[®])
- Lugol (bioMérieux[®])
- Alcohol-acetona
- Safranina (bioMérieux[®])
- Aceite de inmersión
- Peróxido de hidrógeno 3%
- Discos para prueba de oxidasa (BIO RAD)
- MTT (SIGMA)

6. METODOLOGIA

6.1 Obtención de cepas.

Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio 10 de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, procedentes de muestras hospitalarias.

Cepas:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus faecalis*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*

6.2 Corroboración de las Cepas

- Las cepas fueron cultivadas en Agares Selectivos (Agar Sales y Manitol, Agar Sangre, Eosina Azul de Metileno y Ceftrimida respectivamente) a 37° C durante 24hrs.
- Para comprobar si la cepa estaba pura se realizó frotis y tinción de Gram, posteriormente se sembró en agar BHI y se incubó a 37° C durante 24hrs.
- Transcurrido el tiempo de incubación la cepa se estandarizó al 0.5 de la escala de McFarland en SSF estéril, empleando el equipo DensiCHEK plus, sometiendo el estándar en el sistema Vitek 2.



Figura 3. Vitek 2.

- Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado.
- Para cada uno de los siguientes ensayos se ocuparon las cepas sembradas en agar BHI con una incubación de 37° C por 24hrs.

6.3 Ensayos de la SES concentrada a distintos tiempos en tubo

- Para realizar el ensayo se estandarizo con cada cepa al 0.5 de la escala de Mc Farland con SES concentrado, ocupando el equipo DensiCHEK plus.
- Se mezclo con vortex perfectamente y se dejo actuar la SES con cada cepa por un tiempo de 30 segundos, 5, 10 y 15 minutos.
- Se tomo una alícuota de 100 µl en cada tiempo transcurrido y se inoculo en tubos con medio BHI, incubándose a 37° C por 24hrs.
- Después de 24hrs. de incubación se observaron los tubos y se realizaron lecturas visuales.

6.4 Ensayos de la SES a distintas diluciones y tiempos en tubo

- Se prepararon una serie de diluciones dobles seriadas de la solución en estudio:

1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64

- A cada dilución se le realizo directamente la estandarización con cada cepa, al 0.5 de la escala de Mc Farland con ayuda del equipo DensiCHEK plus.
- Se mezclo con vortex perfectamente y se dejo actuar con cada dilución y cepa por un tiempo de 30 segundos, 5, 10 y 15 minutos
- Se tomo una alícuota de 100 µl en cada tiempo transcurrido y se inoculo en tubos con medio BHI, incubándose a 37° C por 24hrs.
- Después de 24hrs. de incubación se observaron los tubos y se realizaron lecturas visuales.

6.5 Ensayos SES concentrada a distintas temperaturas y tiempos en tubo

- La SES concentrada previamente se sometió a distintas temperaturas: 5, 25 y 37° C.
- Se estandarizo con cada cepa al 0.5 de la escala de Mc Farland con SES concentrado, ocupando el equipo DensiCHEK plus.

- Se mezcló con vortex perfectamente y se dejó actuar la SES con cada cepa por un tiempo de 30 segundos, 5, 10 y 15 minutos.
- Se tomó una alícuota de 100 µl en cada tiempo transcurrido y se inoculó en tubos con medio BHI, incubándose a 37° C por 24hrs.
- Después de 24hrs. de incubación se observaron los tubos y se realizaron lecturas visuales.

Nota: La SES fue conservada en la temperatura de estudio durante y después de la estandarización.

6.6 Técnica del Coeficiente Fenólico

- Se preparó una serie de tubos conteniendo cada uno 5 ml de diferentes diluciones porcentuales de la SES (Tabla No 2).

Tabla No. 2 Técnica usada para la realización de las diluciones de la SES.

% de conc.	ml de SES	ml de H ₂ O	Vol. Total
20	1	4.0	5 ml
19	0.950	4.05	5 ml
18	0.90	4.10	5 ml
17	0.85	4.15	5 ml
16	0.80	4.20	5 ml
15	0.75	4.25	5 ml
14	0.70	4.30	5 ml
13	0.65	4.35	5 ml
12	0.60	4.40	5 ml
11	0.55	4.45	5 ml
10	0.50	4.50	5 ml
9	0.45	4.55	5 ml
8	0.40	4.60	5 ml
7	0.35	4.65	5 ml
6	0.30	4.70	5 ml
5	0.25	4.75	5 ml
4	0.20	4.80	5 ml
3	0.15	4.85	5 ml
2	0.10	4.90	5 ml
1	0.05	4.95	5 ml
0	0	5	5 ml

- A la vez se preparo una segunda serie de tubos que contenían diferentes diluciones de fenol.

Tabla No. 3 Técnica usada para la realización de las diluciones del Fenol.

% de conc.	ml de Fenol	ml de H ₂ O	Vol. Total
20	2	3.0	5 ml
19	1.9	3.1	5 ml
18	1.8	3.2	5 ml
17	1.7	3.3	5 ml
16	1.6	3.4	5 ml
15	1.5	3.5	5 ml
14	1.4	3.6	5 ml
13	1.3	3.7	5 ml
12	1.2	3.8	5 ml
11	1.1	3.9	5 ml
10	1.0	4.0	5 ml
9	0.9	4.1	5 ml
8	0.8	4.2	5 ml
7	0.7	4.3	5 ml
6	0.6	4.4	5 ml
5	0.5	4.5	5 ml
4	0.4	4.6	5 ml
3	0.3	4.7	5 ml
2	0.2	4.8	5 ml
1	0.1	4.9	5 ml
0	0	5	5 ml

- Cada tubo de las dos series se inocula con 0,5 ml de un cultivo de 24 horas del microorganismo utilizado como prueba (cepa de *Staphylococcus aureus*), previamente estandarizado al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.
- A los 5, 10 y 15 minutos se recogió una alícuota de cada tubo, en seguida se inoculo en otro tubo que contenía medio de cultivo estéril (BHI).
- Estos tubos inoculados se incubaron durante 24 a 48 horas y se observo el crecimiento del microorganismo (aparición de turbidez).
- La mayor dilución del desinfectante que mate a los microorganismos en 10 minutos pero no los mate en 5 minutos se divide por la dilución mayor de fenol que dé los mismos resultados.

$$C.F. = \frac{\text{Máxima dilución del desinfectante que inhiba en 5 min pero no en 10 min.}}{\text{Máxima dilución del Fenol que inhiba en 5 min pero no en 10 min.}}$$

- El número obtenido es el coeficiente fenólico de ese desinfectante.

Nota: El fenol al inicio está preparado al 50%.

6.7 Dilución en Placa

- Cada dilución de la SES se realizó cuatro veces en una placa de 96 pozos fondo plano, donde cada columna representa una dilución y cada fila una duplicación de la solución. Cabe destacar que la placa se dividió en cuatro ensayos diferentes, de la columna 1 – 6 es una serie de diluciones dobles y un ensayo con una sola bacteria, de la fila “A” – “D” las diluciones fueron con SSF estéril; de la fila “E” – “H” las diluciones se realizaron con agua destilada estéril.
- Se colocaron 100µl de SSF estéril de la columna 2 - 6 y fila “A” – “D” y 100µl de agua destilada estéril en las filas “E” – “H”.
- Después se colocaron 100µl de la SES en todas las filas de la columna 1 y 2.
- A partir de la columna 2 se tomó 100µl de la dilución, transfiriendo a la columna 3, se mezcló y se realizó sucesivamente en las siguientes columnas hasta la columna 6, en donde se desecharon los últimos 100µl.
- Posteriormente se adicionó 100µl de la bacteria previamente estandarizada al 0.5 de la escala de Mc Farland con SSF estéril en las columnas donde se realizaron las diluciones en todas las filas.
- A partir de que se adicionó 100µl de la bacteria estandarizada se dejó actuar la SES con las distintas cepas por un tiempo de 30 segundos, 5, 10 y 15 minutos
- Se detuvo la reacción adicionando a cada pozo 100µl de caldo BHI.
- Incubar la placa a 37° C por 24hrs.
- Pasado el tiempo de incubación se agregó a toda la placa 5µl del reactivo MTT, el cual presenta un color amarillo.
- Se incubó nuevamente la placa a 37° C por 15 minutos.
- Al cabo de este tiempo se realizaron las lecturas visuales y espectrofotométricas.

NOTA: a partir de los pasos 1 al 5 se realizaron de la misma manera pero en las columnas 7 – 12.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de las bacterias

Con respecto a la identificación de las bacterias empleadas en este trabajo, se manejaron cepas aisladas de casos clínicos, las cuales se sometieron al sistema Vitek 2 (ver informes a continuación).

LABORATORIO ESTERIPHARMA

Nº de cliente: 7277
Equipo Nº:

Informe de examen

Editado 13-jul-2011 11:38 CST
Editado por: Lmendoza

Nombre del paciente: Cepas referencia
Examen: 0156-11-1

Nº paciente: 0155-11

Bionúmero: 010402062763231
Organismo seleccionado: Staphylococcus aureus

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242213240	Fecha caduc.: 15-oct-2012 12:00 CST
	Finalizado: 29-jun-2011 17:23 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,00 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Staphylococcus aureus		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 010402062763231		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Acción	Nombre (ID de usuario)	Fecha/Hora	Comentario
Revisado por:	(vlopez)	30-jun-2011 09:12 CST	

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 04.02
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

LABORATORIO ESTERIPHARMA

Nº de cliente: 7277
Equipo Nº:

Informe de examen

Editado 13-jul-2011 11:40 CST
Editado por: Lmendoza

Nombre del paciente: Cepas referencia
Examen: 0161-11-1

Nº paciente: 0155-11

Bionúmero: 114002721773471
Organismo seleccionado: Enterococcus faecalis

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242213240	Fecha caduc.: 15-oct-2012 12:00 CST
	Finalizado: 24-jun-2011 18:06 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,00 horas
Organismo seleccionado	89% Probabilidad	Enterococcus faecalis	
	Bionúmero: 114002721773471	Nivel de confianza: Identificación buena	
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Enterococcus faecalis LeuA(79),CDEX(96),AGLU(83),O129R(99),			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	dSOR	+	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Acción Revisado por: Nombre (ID de usuario) (Lmendoza) Fecha/Hora 27-jun-2011 08:53 CST Comentario

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 04.02
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

LABORATORIO ESTERIPHARMA

Nº de cliente: 7277
Equipo N°:

Informe de examen

Editado 13-jul-2011 11:39 CST
Editado por: Lmendoza

Nombre del paciente: Cepas referencia
Examen: 0160-11-1

Nº paciente: 0155-11

Bionúmero: 0405610450420611
Organismo seleccionado: Escherichia coli

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GN	Nº de lote: 241193940	Fecha caduc.: 05-abr-2012 12:00 CST
	Finalizado: 24-jun-2011 16:06 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,00 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Escherichia coli		Nivel de confianza: Identificación excelente
Bionúmero: 0405610450420611			
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Acción	Nombre (ID de usuario)	Fecha/Hora	Comentario
Revisado por:	(Lmendoza)	27-jun-2011 08:53 CST	

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 04.02
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

LABORATORIO ESTERIPHARMA

Nº de cliente: 7277
Equipo Nº:

Informe de examen

Editado 13-jul-2011 11:40 CST
Editado por: Lmendoza

Nombre del paciente: Cepas referencia
Examen: 0162-11-1

Nº paciente: 0155-11

Bionúmero: 0003043201500040
Organismo seleccionado: Pseudomonas aeruginosa

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GN	Nº de lote: 241193940	Fecha caduc.: 05-abr-2012 12:00 CST
	Finalizado: 24-jun-2011 17:05 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,00 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Pseudomonas aeruginosa		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0003043201500040		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	(+)	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Acción	Nombre (ID de usuario)	Fecha/Hora	Comentario
Revisado por:	(Lmendoza)	27-jun-2011 08:53 CST	

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 04.02
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

7.2 Diluciones en tubo de la SES a diferentes tiempos

Tabla No. 4 Resultados de SES a diferentes concentraciones y tiempos con *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteria	Dilución/ ppm	30 seg.	5 min	10 min	15 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	Conc. / 60	+	-	-	-
	1:2/30	+	-	-	-
	1:4/15	+	+	+	-
	1:8/7.5	+	+	+	+
	1:16/3.75	+	+	+	+
	1:32/1.875	+	+	+	+
	1:64/0.9375	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	Conc. / 60	-	-	-	-
	1:2/30	-	-	-	-
	1:4/15	+	+	-	-
	1:8/7.5	+	+	+	+
	1:16/3.75	+	+	+	+
	1:32/1.875	+	+	+	+
	1:64/0.9375	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Conc. / 60	-	-	-	-
	1:2/30	-	-	-	-
	1:4/15	+	+	+	-
	1:8/7.5	+	+	+	+
	1:16/3.75	+	+	+	+
	1:32/1.875	+	+	+	+
	1:64/0.9375	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Conc. / 60	-	-	-	-
	1:2/30	+	-	-	-
	1:4/15	+	+	+	-
	1:8/7.5	+	+	+	+
	1:16/3.75	+	+	+	+
	1:32/1.875	+	+	+	+
	1:64/0.9375	+	+	+	+

Nota

(+) Existe desarrollo bacteriano

(-) No Existe desarrollo bacteriano

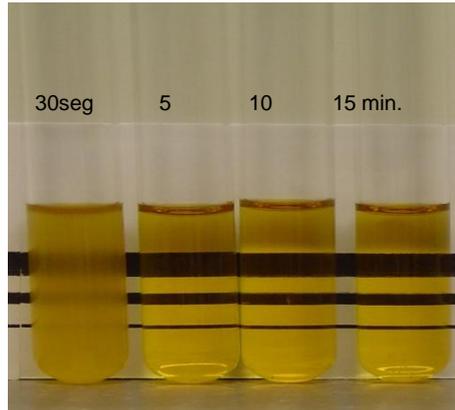


Foto 1. Resultado *Staphylococcus aureus* y SES de 60 ppm.

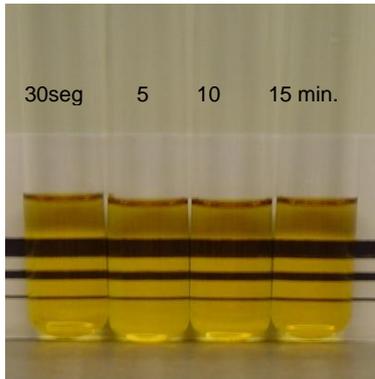


Foto 2. Resultado *St. faecalis* y SES de 60 ppm.

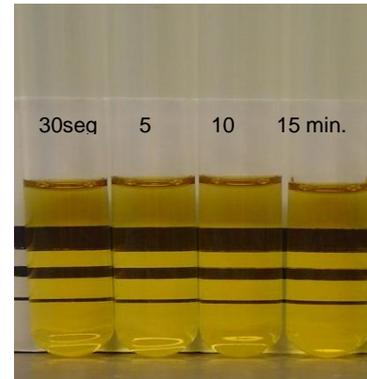


Foto 3. Resultado *E. coli* y SES de 60 ppm.

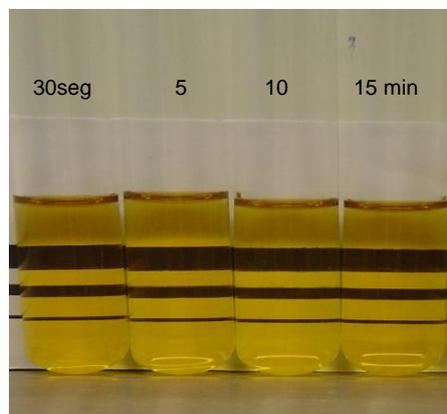


Foto 4. Resultado *P. aeruginosa* y SES de 60 ppm.

7.3 Temperatura de la SES a diferentes tiempos

Tabla No. 5 Resultados de la SES concentrado a diferentes temperaturas (25, 37 y 5°C) y tiempos con *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacteria	Temperatura	30 seg	5 min	10 min	15 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ambiente	+	-	-	-
	37°C	+	-	-	-
	5°C	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	Ambiente	-	-	-	-
	37°C	-	-	-	-
	5°C	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	Ambiente	-	-	-	-
	37°C	-	-	-	-
	5°C	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ambiente	-	-	-	-
	37°C	-	-	-	-
	5°C	+	+	-	-

Nota

(+) Existe desarrollo bacteriano

(-) No Existe desarrollo bacteriano

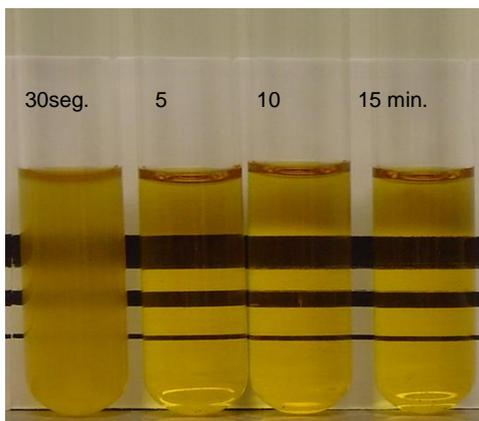


Foto 5. Resultado *Staphylococcus aureus* y SES de 60 ppm a 37 ° C.

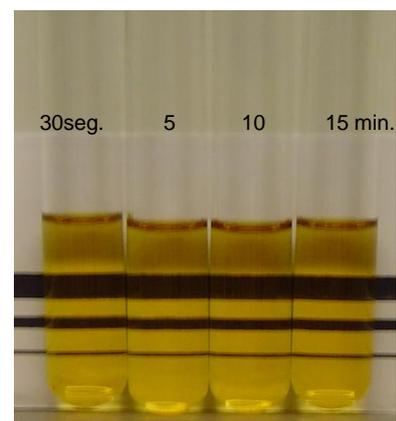


Foto 6. Resultado *St. faecalis* y SES de 60 ppm a 37 ° C.

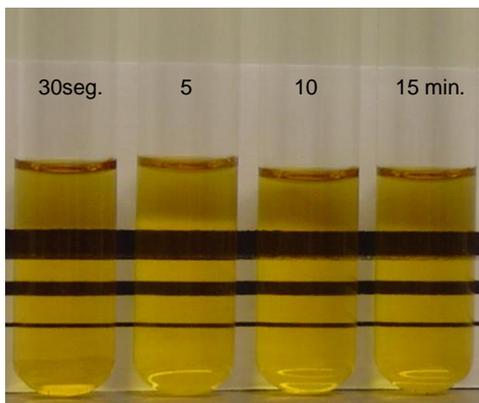


Foto 7. Resultado *E. coli* y SES de 60 ppm a 37 ° C.

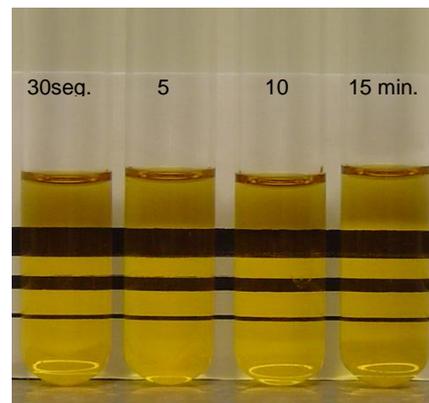


Foto 8. Resultado *P. aeruginosa* y SES de 60 ppm a 37 ° C.

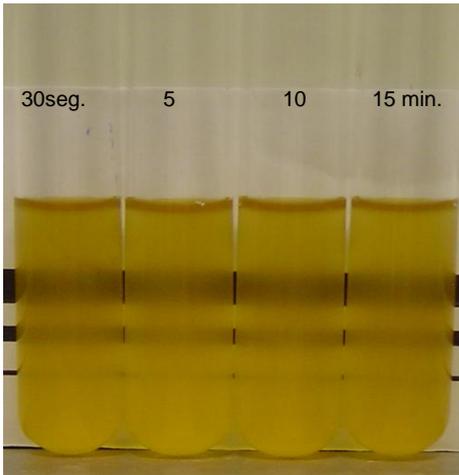


Foto 9. Resultado *Staphylococcus aureus* y SES de 60 ppm a 5 ° C.

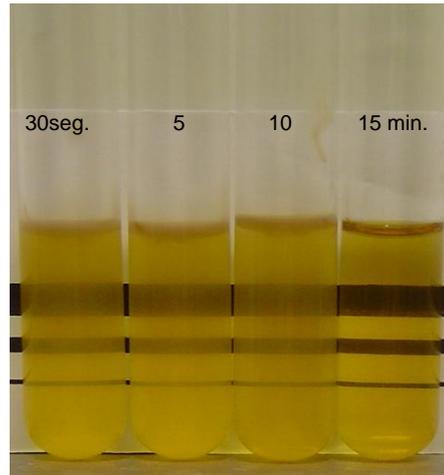


Foto 10. Resultado *St. faecalis* y SES de 60 ppm a 5 ° C.

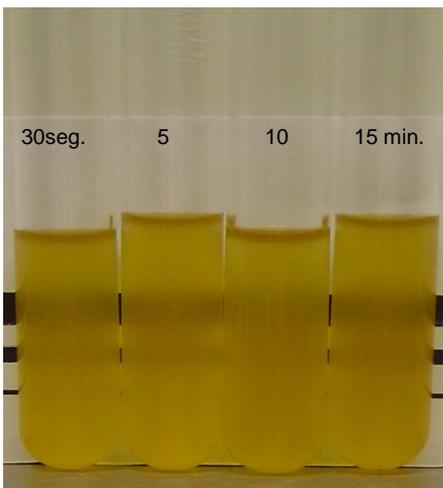


Foto 11. Resultado *E. coli* y SES de 60 ppm a 5 ° C.

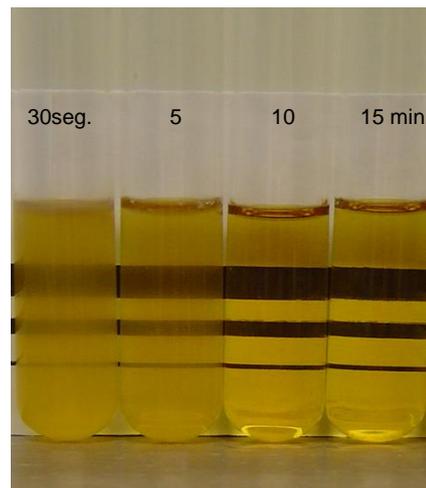


Foto 12. Resultado *P. aeruginosa* y SES de 60 ppm a 5 ° C.

7.4 Coeficiente Fenólico

Tabla No. 6 Resultados del índice fenólico de la SES con *Staphylococcus aureus* a diferentes tiempos.

% de conc.	Solución electrolizada de superoxidación con pH neutro			Fenol		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
20	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-
1	+	+	+	+	+	+
0	+	+	+	+	+	+

Nota

(+) Existe desarrollo bacteriano

(-) No Existe desarrollo bacteriano

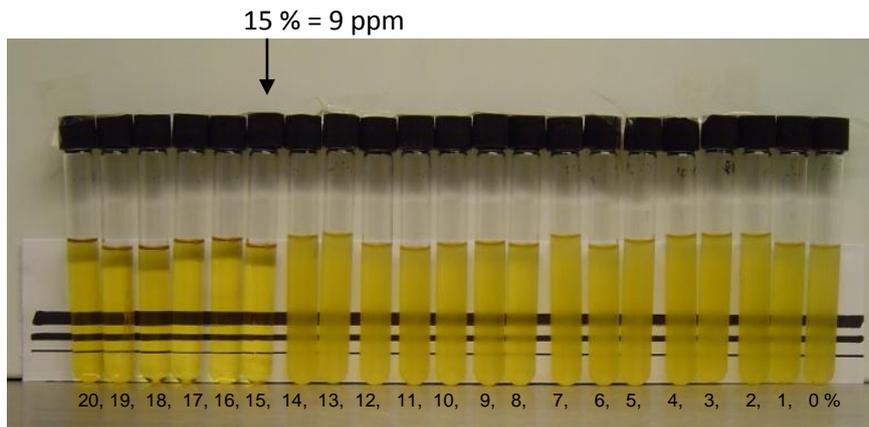


Foto 13 Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 5 minutos.

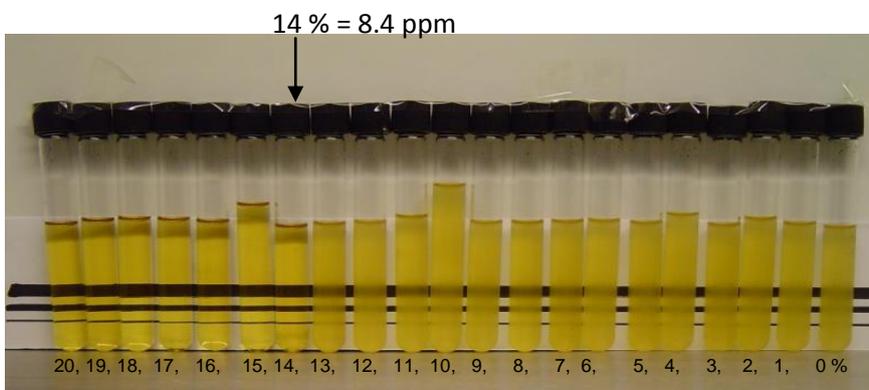


Foto 14. Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 10 minutos.

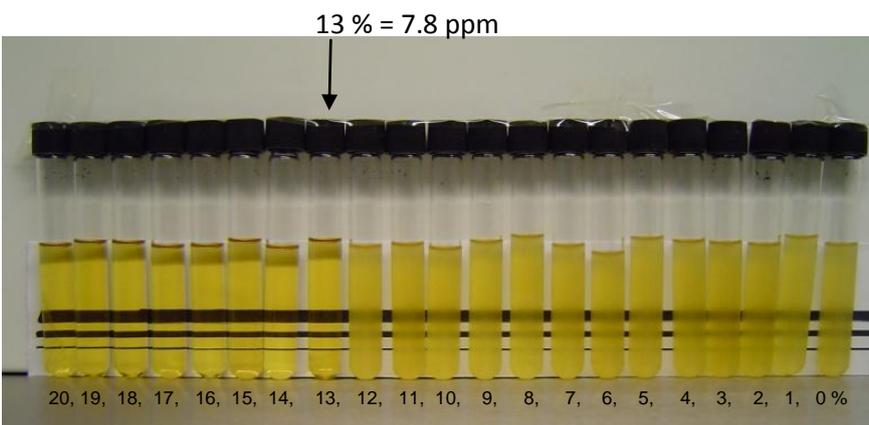


Foto 15. Ensayo de coeficiente fenólico con SES de 60 ppm y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 15 minutos.

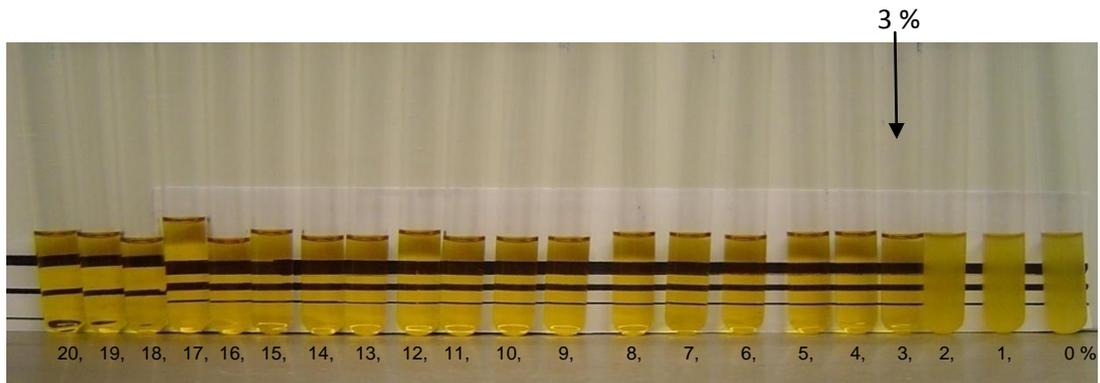


Foto 16. Ensayo de coeficiente fenólico y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 5 minutos.

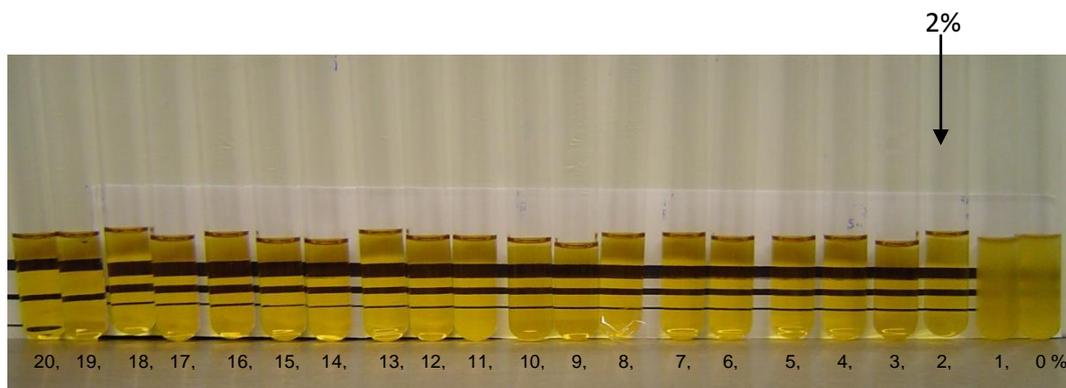


Foto 17. Ensayo de coeficiente fenólico y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 10 minutos.

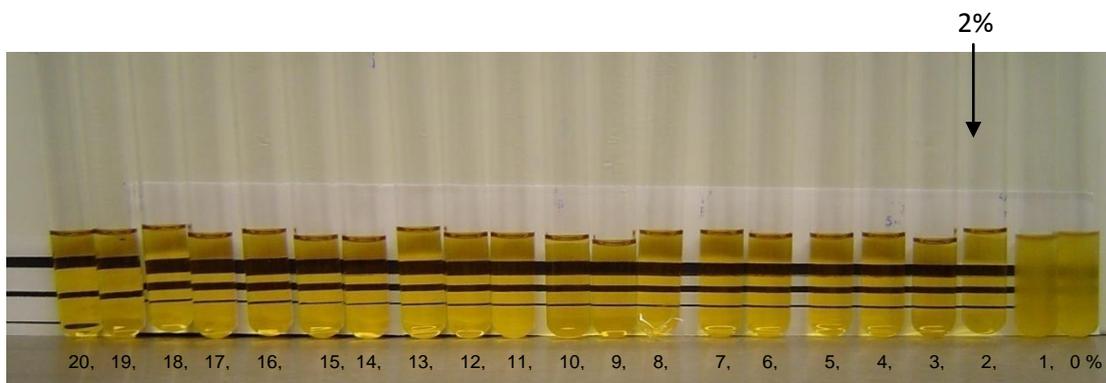


Foto 18. Ensayo de coeficiente fenólico y *Staphylococcus aureus*. La flecha indica la dilución más alta que inhibe a los 15 minutos.

7.5 Técnica Colorimétrica de Mosmann

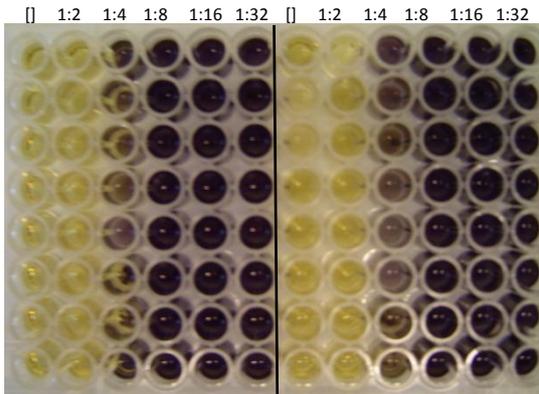


Foto 19. Efecto de la SES en *Staphylococcus aureus* evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

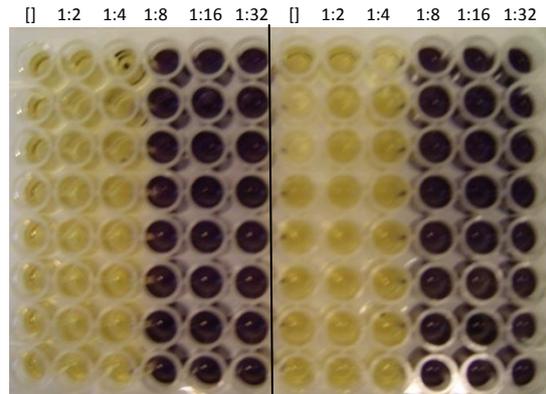


Foto 20. Efecto de la SES en *Staphylococcus aureus* evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

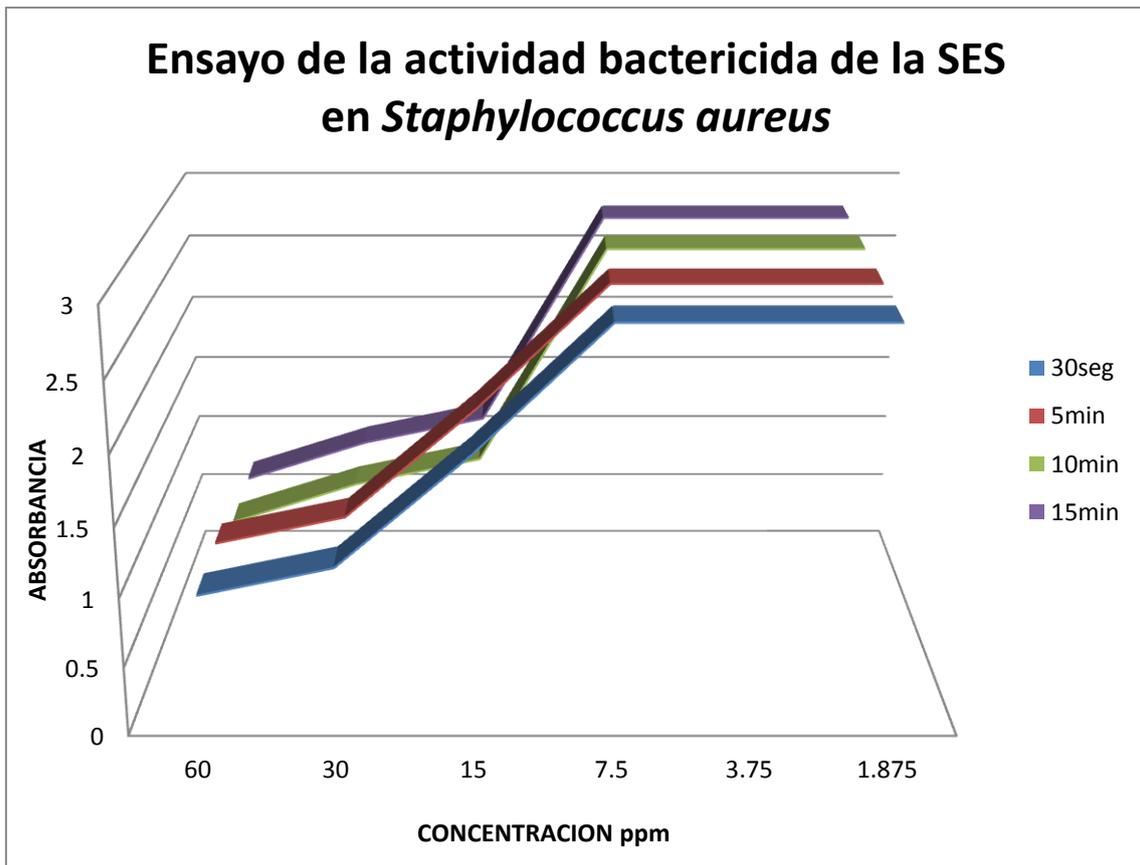


Gráfico No. 1 Determinación de la MIC, de la SES en *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones. Obsérvese que hasta 15 ppm, el desarrollo de la bacteria es inhibido.

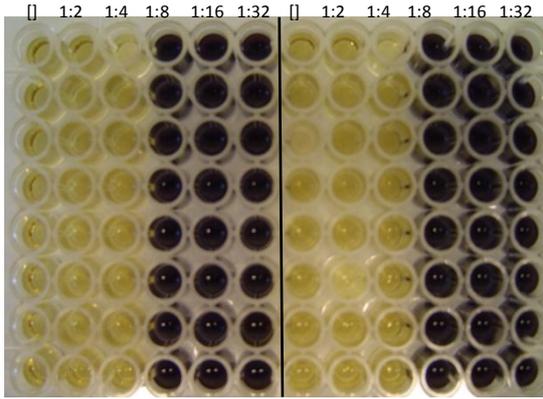


Foto 21. Efecto de la SES en *Escherichia coli* evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

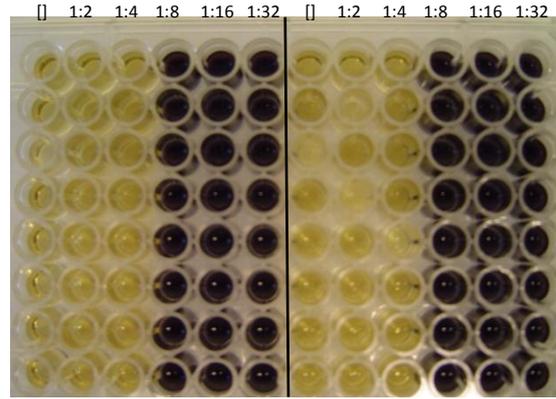


Foto 22. Efecto de la SES en *Escherichia coli* evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

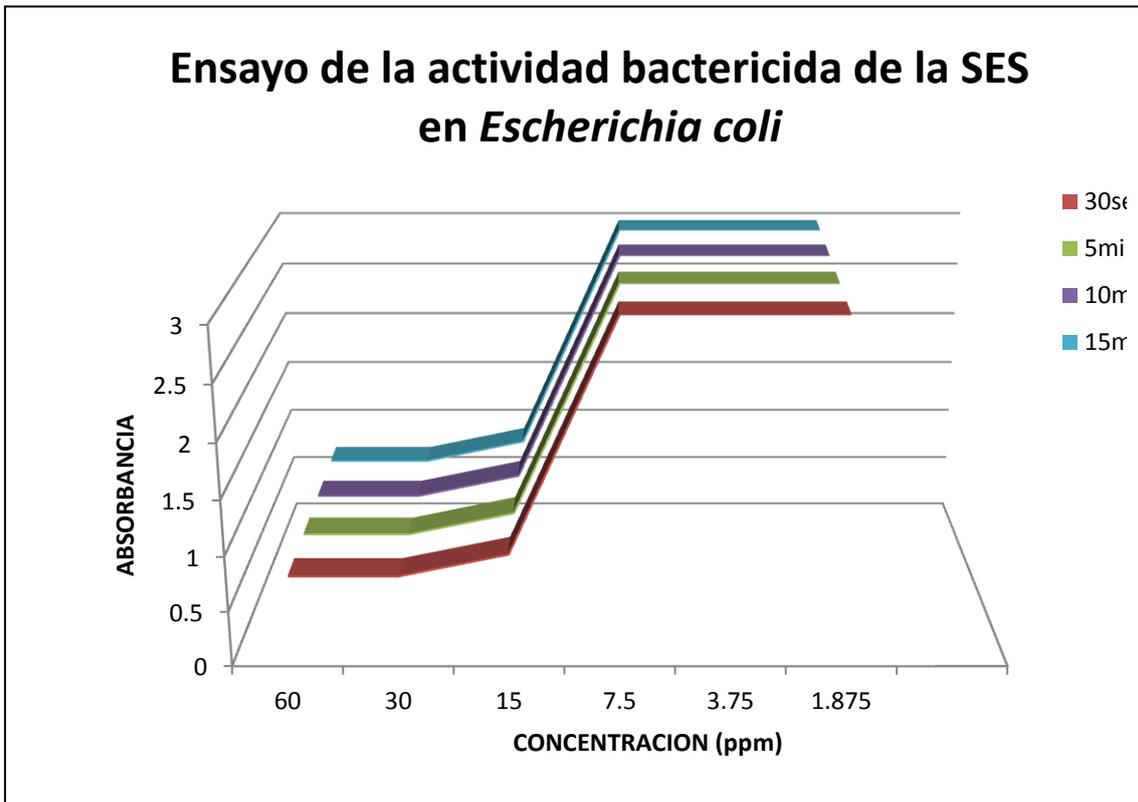


Grafico No. 2 Determinación de la MIC, de la SES en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones. Obsérvese que hasta 15 ppm, el desarrollo de la bacteria es inhibido.

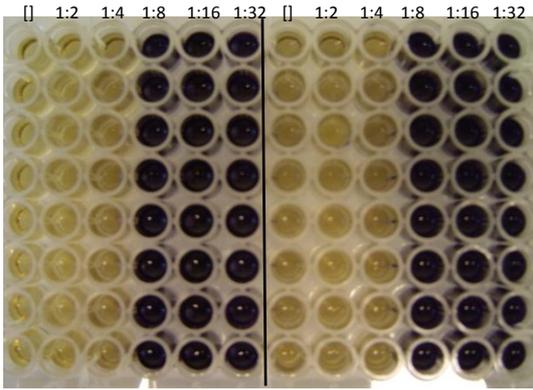


Foto 23. Efecto de la SES en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por el método de Mosmann a 30 seg. y 5 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

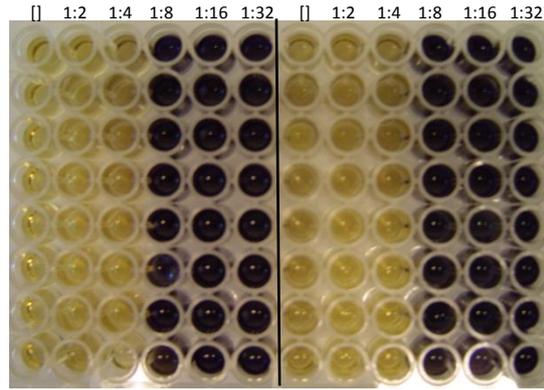


Foto 24. Efecto de la SES en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por el método de Mosmann a 10 y 15 min, izquierdo y derecho respectivamente. Nótese que no existe diferencia en cuanto al tiempo.

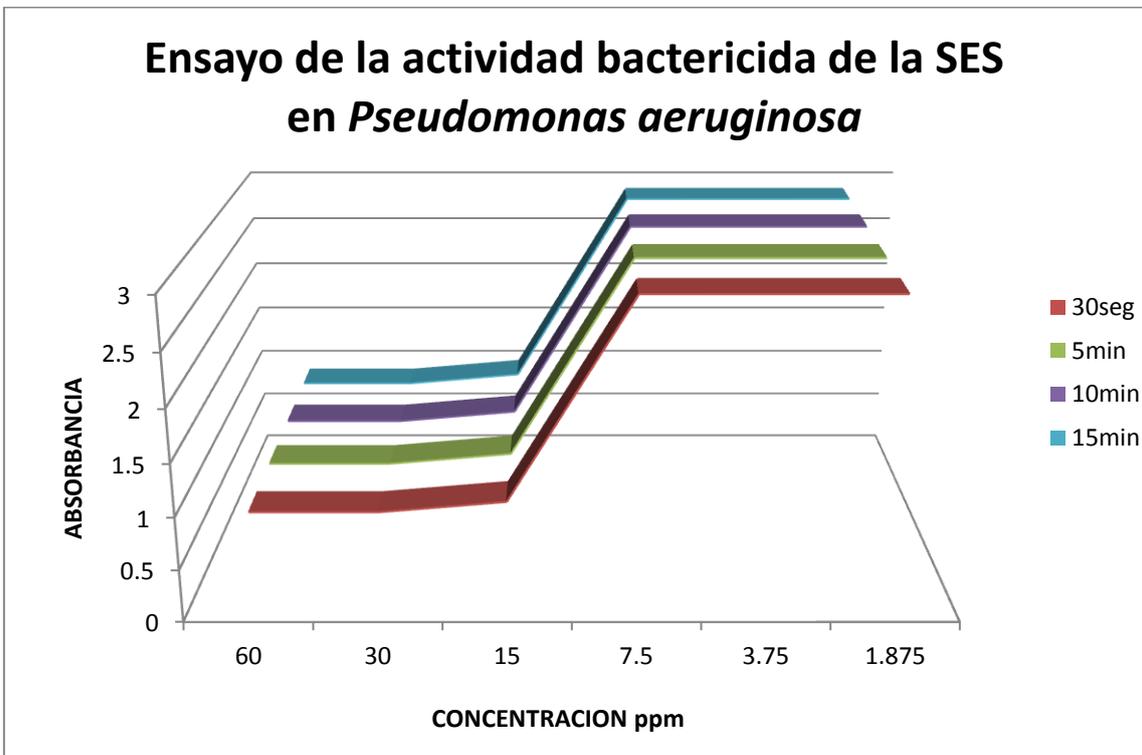


Gráfico No. 3 Determinación de la MIC, de la SES en *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones. Obsérvese que hasta 15 ppm, el desarrollo de la bacteria es inhibido.

7.6 Microfotografías electrónicas de *Streptococcus faecalis*

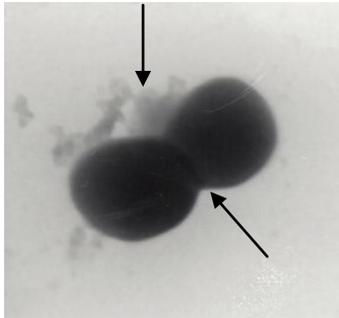


Foto No. 25 Microfotografía Electrónica de Transmisión a 15000 aumentos, *Streptococcus faecalis*, después de un periodo de incubación a 37°C en BHI (Infusión Cerebro Corazón) agar, tratado con SSF estéril y teñido con ácido fosfotúngstico. Nótese la célula en proceso de división, la pared celular bien definida, sin protuberancias ni daño aparente y electrodensa. Se observa un poco de materia orgánica resultado del medio de cultivo.

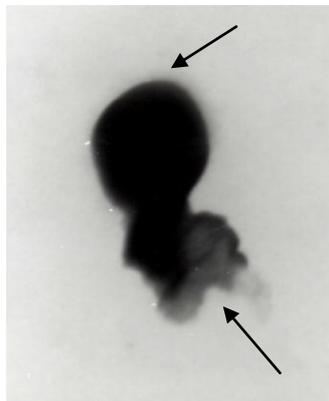


Foto No. 26 Microfotografía Electrónica de Transmisión a 15000 aumentos, *Streptococcus faecalis*, después de un periodo de incubación a 37°C en BHI (Infusión Cerebro Corazón) agar, tratado con SES de 60 ppm y teñido con ácido fosfotúngstico. Nótese la célula en proceso de división, la pared celular lesionada en el extremo inferior, sin definición, con protuberancias, daño aparente y electrodensa.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con respecto a la identificación de las bacterias usadas en este trabajo, se sometieron al sistema automatizado Vitek 2, este sistema de identificación bacteriana, es automático, rápido, confiable, con el tiempo mínimo de entrenamiento, ofrece una mayor automatización y aumenta la seguridad y la eliminación de las operaciones manuales repetitivas. Las bacterias que se identificaron en este sistema, arrojaron porcentajes de certeza de 99, 89, 99 y 99%, para *S. aureus*, *St. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente. Para establecer un equilibrio de las bacterias seleccionadas dos de ellas (50%) fueron Gram (+) y dos (50%) Gram (-).

Una vez establecida la identificación de las cuatro bacterias, fueron ensayadas con SES de 60 ppm, debido a que se evalúa la eficacia de los desinfectantes por medio de técnicas *in vitro*. Este tipo de pruebas son realizadas en los laboratorios bajo condiciones controladas como concentración, tiempo, temperatura, microorganismo y reproductibilidad.

En este trabajo se realizaron dos técnicas para la evaluación de la solución desinfectante; Dilución en Tubo e Índice Fenólico (Test de Ridell Walter), basándose conforme a las normas internacionales descritas que en distintos países se proponen como la AFNOR (Francia), AOAC (USA), DGHM (Alemania), cuyos ensayos tienen validez.⁵

En el primer ensayo realizado se manejaron distintas diluciones del desinfectante en cuatro tiempos diferentes que fueron 30 segundos, 5, 10 y 15 minutos, como resultado podemos observar en la tabla No 4 que la SES concentrada, dilución 1:2 y dilución 1:4 respectivamente con tiempo no mayor de 10 minutos en tres bacterias fueron inhibidas por el efecto de la SES, sin embargo la bacteria que tuvo un poco más de resistencia después de 10 minutos en dilución 1:4 fue *S. aureus*, debido a que esta cepa bacteriana tiene la característica de ser más resistente a los desinfectantes en este tipo de evaluaciones microbiológicas, por este motivo las normas internacionales denotan que se debe evaluar el efecto bactericida con dicha cepa.^{31,40 – 42, 45}

Nachón García F.J. et. al., en su trabajo publicado en 2008, hace referencia a la actividad de SES en diferentes bacterias (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) encontrando que a un tiempo no mayor de 15 minutos inhibe su crecimiento.³⁰

Además en la prueba realizada a las cepas, se determinaron y controlaron dos variables: concentración y tiempo, las cuales pueden afectar la acción de un desinfectante, pero sin embargo la prueba de dilución en tubo describe que la solución solo va a tener efecto bactericida a una dilución óptima. Por otro lado es importante determinar el tiempo pero de igual forma evaluar la temperatura en el que actúa la SES.

Con respecto a la prueba del coeficiente fenólico, la cual compara la acción bactericida de un determinado desinfectante frente a la del fenol y además esta validada por la AOAC (Phenol Coefficient Method 955.11).⁵ Los resultados son expresados cualitativamente (turbidez) con cada uno de los tiempos de exposición, tomando en cuenta la dilución del desinfectante y del fenol. Dicho resultado se aplica en una ecuación; si el número es menor a 1 no se recomienda la utilización del desinfectante por lo menos a esa concentración (AOAC). Tomando en cuenta todo lo anterior descrito, se obtuvo el 14% del desinfectante y del fenol fue de 2%, aplicando la ecuación mencionada (ver pag. 21) se obtuvo un índice fenólico de 0.14, por lo que al desinfectante no se debe preparar a una concentración mayor al 14% para desinfectar.

Para comprobar el efecto de SES en las diferentes bacterias, en primera instancia se ensayó la técnica de macro dilución en tubo, en la cual se necesitan volúmenes en ml, encareciendo los reactivos si lo comparamos con la técnica en microplaca que se usan microlitros (μ l), donde de igual manera se tiene más exactitud en el pipeteo para las diluciones y que además permite realizar una mayor cantidad de pruebas.

Las pruebas de macro y Microdilución pueden ser interpretadas por nitidez y/o turbidez, sin embargo un método que no empleé el ojo humano es más confiable. Por tal razón, implementamos el método colorimétrico de Mosmann, el cual se basa en la reducción (violeta) del azul de tetrazolio (MTT), por efecto de deshidrogenasas bacterianas a formazan (sal insoluble),^{6, 11}, indicándonos que el desinfectante a la dilución 1:8 no produjo inhibición de la bacteria ensayada, caso contrario cuando el MTT no es reducido (amarillo), nos indica que la bacteria en la dilución 1:4 del desinfectante si fue inhibida, a todo esto se le realizo una lectura espectrofotométrica a 530 nm de λ (Ver Fotos 19 – 24 y Graficos1 - 3).

En cuanto a la temperatura se detecto un pequeño cambio en la actividad del desinfectante, siendo mejor a 25 y 37 que a 5 ° C en las cuatro bacterias probadas. No existe bibliografía reportada en cuanto a temperatura con SES que pudiéramos comparar con nuestro trabajo, sin embargo, elevar la temperatura en el momento de actividad de un desinfectante incrementaría su potencia.⁴⁰

Para evidenciar el daño que produce la SES en las bacterias se hizo la Tinción Negativa, la cual se basa en contrastar la muestra impregnándola con una sal de un metal pesado (acido fosfotúngstico al 2%), que permite observar mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo”, o de tinción negativa. Los reactivos son utilizados en esta técnica presentan las siguientes propiedades: interactúan mínimamente con la muestra, son estables en la interacción con los electrones, son altamente solubles en agua, presentan una alta densidad que favorece el contraste y tiene un punto alto de fusión. Además la muestra requiere estar protegida con metales pesados para que soporten la interacción de los electrones de alta energía, deben de tener un grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos a través de la muestra y así poder tener una imagen con una buena resolución.

En la foto 25 se puede observar la bacteria *Streptococcus faecalis* tratada con SSF estéril, la cual presenta un proceso de división, la pared celular está bien

definida, sin protuberancias ni daño aparente y electrodensa. Alrededor se observa materia orgánica debido al resultado del medio de cultivo.

En cambio la foto 26, la bacteria *Streptococcus faecalis* tratada con SES, de igual forma presenta un proceso de división, pero en la pared celular se observa la lesión causada por la SES. Esto demuestra el efecto que tiene dicha solución y que describe de manera teórica Cabello Gutiérrez Carlos (2004), Nachón García Francisco J. (2008) y Yu – Ru Huang (2008), et. al., donde mencionan que este tipo de soluciones tienen la capacidad de oxidar grupos sulfídrico (-SH) y aminoácidos de la pared bacteriana provocando el rompimiento, por consecuencia afecta el proceso de respiración y nutrición, produciéndose oxidación de los componentes respiratorios, inhibición en la síntesis de proteínas, alteración en la energía (adenosin fosfato), rompimiento de las cadenas de RNA y represión en la síntesis de moléculas del metabolismo celular.^{10, 30, 33, 46}

Por todo lo anterior discutido, creemos que es necesario seguir investigando alrededor de las SES, ya que se pueden ampliar las técnicas; como realizar una tinción con Bromuro de Etidio para ácidos nucleicos o Azul de Toluidina³⁹ para membrana celular, lo cual nos permitiría evidenciar con más exactitud los sitios de acción de dichas soluciones.

9. CONCLUSIONES

- Se logro determinar el efecto bactericida de la SES evaluándola con diferentes bacterias, utilizando variables de concentración, temperatura y tiempo de exposición.
- El sistema automatizado Vitek 2 permitió identificar las bacterias propuestas para este estudio.
- Se evaluaron las diferentes concentraciones para el efecto bactericida de la SES encontrando que la óptima fue de 1:4.
- Se determino que el tiempo requerido de exposición de las SES es de 10 minutos, para tener un efecto bactericida.
- Se estableció que la temperatura de la SES que tiene efecto bactericida es a 25 y 37 ° C.
- Se compararon los resultados obtenidos en cada una de las técnicas utilizadas (Técnica del Coeficiente Fenólico, Dilución en Tubo y Mossman) para encontrar la MIC, observando entre ellas resultados similares.
- El método de Mosmann nos permitió realizar lecturas más exactas.
- El daño que causa la SES en bacterias es a nivel de pared celular, esto fue evidenciado a través de una tinción negativa y MET.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Acosta S. I., Valeska A., (2008). Manual de esterilización para los centros de Salud. Organización Panamericana de Salud. Washington. USAID.
2. Adolfo Chaves Gustavo, et. al., (2004). Producción de Agua Electrolizada para Eliminación de Microorganismos en Lechuga. Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. 9, pg. 91-100.
3. Aguilar Reguero J. Ramón. Limpieza, Desinfección y Esterilización del Material, Equipamiento y Vehículos Sanitarios. www.emergencias.es.org, Málaga, España.
4. Arévalo JM, Arribas JL, Hernández Ma. J., et al. Sociedad Española de Medicina Preventiva: Guía de utilización de antisépticos. <http://mpsp/documentos/desinfec/antisept.htm>
5. Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) (2000). Off. Meth. Analysis. Testing Disinfectants and Phenol Coefficient Method 955.11, pg. 1117.
6. Bautista Garfias Carlos R., (2000). Evaluación del Bioensayo de MTT para determinar la proliferación *in vitro* de linfocitos de bovino frescos y congelados. <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-02/RVM31204.pdf>
7. Bidou, Dora Beatriz (1977). Fundamentos y Técnicas de Esterilización. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
8. Block, S. S. (1991). Disinfection, sterilization and preservation. Lea & Febiger, 4th Edit., Philadelphia.
9. Borja Hernani Ana, et. al., (2002). Manual de Desinfección y Esterilización Hospitalaria. Ministerio de Salud. Lima, Perú.
10. Cabello Gutiérrez Carlos, et. al., (2004). Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. Revista del Instituto de Enfermedades Respiratorias. 22, pg. 280 – 287.
11. Castro de Pardo Clemencia (2006). Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT. http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
12. Crabtree TD, Pelletier SJ, Pruett TL. Surgical antisepsis. In: Block S.S, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkinson, 2001, pg. 919-934.

13. Desinfectantes y antisépticos: Aldehídos.
<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c712.htm>
14. Desinfectantes de uso hospitalario
<http://www.codeinep.org/control/DESINFECTANTES%20DE%20USO%20HOSPITALARIO.pdf>
15. Díaz Acosta Alondra E., Membrillo Hernández Jorge, (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químicas – Bilógicas*. 9, pg. 34 – 44.
16. Díaz Téllez José, et. al., (2010). Lavado peritoneal transoperatorio con solución electrolizada por selectividad iónica en peritonitis secundaria. *Revista Cirujano General*. 32, pg. 11 – 16.
17. Drosau A, Falabella A, Kirsner RS. Antiseptics on wounds: An Area of controversy. *Wounds* 15 (2003), pg.149-166.
18. Duran Vega Héctor C. (2010). Solución de Superoxidación y su Evolución Tecnológica. *Revista Dolor*. 3, pg. 3 -7.
19. Electrodiálisis, (2002). <http://apuntescientificos.org/electroforesis.html>
20. Fernández Andreu Carlos M., et. al., (1998). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés medico. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 50, pg. 48 – 53.
21. Flores Martínez Miguel A., (2008). Solución electrolizada por selectividad iónica de pH neutro en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Revista Mexicana de Odontología Clínica*. 3, pg. 16 – 22.
22. Font Elisabet, (2001). Antisépticos y desinfectantes. OFFARM www.dfarmcia.com
23. García R. M. M., et. al., (2011). Evaluación comparativa del efecto crioprotector de los ácidos linoleico y oleico en oocitos de bovino. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 27, pg. 103 – 107.
24. Garzón L. E., Vega Romero R. R., et. al., (2004). Guía para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias: Uso de Desinfectantes. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá: Oficina de Comunicación de Salud. Bogotá, Colombia.
25. Iáñez Enrique, (2005). Agentes Químicos. Facultad de Ciencias Universidad de Granada. Sitio web para la consulta de Microbiología general <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>

26. Ibieta Zarco Blanca R., et. al., (2008). Nueva Opción Analgésica en el Tratamiento de Osteonecrosis Mandibular Secundaria al Uso de Bisfosfonatos. *Revista de Cancerología*. 3, pg. 89 – 94.
27. Luque IG, Lòpez C, Tarradas C, et al. Sensibilidad in vitro de cepas de *Streptococcus suis* frente a diferentes desinfectantes y antisépticos. <http://www.exopol.com/general/circulares/166.html>
28. Microbiología clínica: esterilización, desinfección y asepsia. <http://www.unaverra.es/genmic/microclinica/tema7.pdf>
29. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 12 (1999), pg.147-179.
30. Nachón García Francisco J., et. Al., (2008). Esterilización por inmersión. Estudio comparativo entre glutaraldehído al 2%, agua electrolizada superoxidada con pH neutro y solución electrolizada por selectividad iónica con pH neutro. *Revista Medica U.V*. 32, pg. 5 – 10.
31. NMX – BB – 040 – SCFI – 1999. Métodos Generales de Análisis – Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas.
32. Okunishi Junji, et. al., (2010). Bactericidal Effect of HM – 242, a Novel Disinfectant, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biocontrol Science*. 15, pg. 7 – 13.
33. Osafune T., Ehara T. y Ito T., (2006). Electron microscopic studies on bactericidal effects of electrolyzed acidic water on bacteria derived from kendo protective equipment. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 11, pg. 206 – 214.
34. Piédrola G., (2002). *Medicina Preventiva y Salud Publica*. 10ª ed. Masson. España. pg 416 – 423.
35. Procedimientos de curación: antisépticos y desinfectantes. <http://www.pue.cl/sw-educ/enfermeria/manejoheridas/html/antiseptico.html>
36. Rodríguez EF. La desinfección como práctica útil en la lucha contra las infecciones animales http://ourworld.compusive.com/homepages/academia_veterinaria/news26.htm.
37. Rodríguez Pérez Abilio U., (2006). Evaluación de la actividad bactericida *in vitro*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 53, pg. 123 -125.
38. Rodríguez Pérez Abilio U., (2006). La desinfección – anisepsia y esterilización en la atención primaria de salud. *Laboratorios*. *Revista Cubana Medicina Integral General*. 22, pg. 60 – 72.

39. Rutala W., Webwe D: J., et. al., (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. University of North Carolina Health Care System. Pg. 1 – 158.
40. Rutala, W., (1996). Selection and Use of Disinfectants in Health Care. Mayhall Hospital Epidemiology and Infection Control. Maryland: G. Baltimore.
41. Sánchez Saldaña L., Sáenz Anduaga E., (2005). Antisépticos y Desinfectantes. Dermatología Peruana. 15 (2005), pg. 82 – 103.
42. Silvestre C. et. al. Esterilización. ANALES Sis San Navarra, 23 (2000), pg. 95 – 103.
43. Sykes, G. (1965). Desinfection and sterilization. Chapman and Hall, Second edition, London.
44. Vignoli R., (2006). Esterilización y Desinfección. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2ª ed. Femur. Uruguay. Pg. 609 – 629.
45. Yang H., et. al., (2003). The Effect of pH on Inactivation of Pathogenic Bacteria on Freshcut Lettuce by Dipping Treatment with Electrolyzed Water. Journal of Food.
46. Yu – Ru Huang, et. al., (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. Elsevier. 19, pg. 329 – 345.