

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN DESINFECTANTE
FORMULADO A BASE DE OREGANO (*Lippia graveolens*), EN LA
SANITIZACION DEL EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA EN
LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES DEL
HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS BENJAMIN BLOOM"

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

ROGER ALEXANDER BAUTISTA MURCIA.

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2002.

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

AMERICA CENTRAL



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

DRA. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIA GENERAL

LICDA. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. MARIA ISABEL RAMOS DE RODAS

SECRETARIA

LICDA. ANA ARELY CACERES MAGAÑA

ASESORAS

LICDA. CORALIA FIGUEROA DE MURILLO
LICDA. RINA ANTONIETA TOLEDO MENDOZA.

JURADO CALIFICADOR

LICDA. CATALINA INES AGUIRRE DE AGUIRRE
LICDA. NORMA ESTELA CASTRO CÁLIX
ING. MARIA DEL CARMEN GUILLEN DE MEDRANO.

AGRADECIMIENTOS .

Gracias Padre por poner en mi camino hijos e hijas tuyos,
quienes colaboraron voluntariamente en el desarrollo y
ejecución de esta Investigación:

Lic. Rina Antonieta Toledo Mendoza.

Lic. Coralia Figueroa de Murillo.

Lic. Azucena de Meléndez

Concepción de Cazares.

Ing. Edwin Alvarenga.

Sr. Wilbert Guzmán

APSAL

Sr. Oscar Coreas

Br. Víctor Sánchez S.

Lic. Carlos Raúl Rodríguez

Patricia Inés Castillo de Rivas

Su tiempo, paciencia, confianza y conocimientos aportados, han
hecho realidad, poder alcanzar esta meta.

Infinitas gracias y que Dios los bendiga.

Roger Bautista.

DEDICATORIA

A Ti Padre Todopoderoso, Creador y Dador de Vida, sabiduría infinita; gracias por derramar El Santo Espíritu de tu Hijo Jesús, mi Rey y Salvador, inspirador de la Fe, la Esperanza y el Amor.

A José Antonio y Ana Edith; Iris Esmeralda y Wendy Karel; por ser la más grande bendición dada en la vida: Mi Familia.

A mis amigas, amigos y familiares: Karla (Q. D. D. G.), Lety, Ely, Karen, Marielos, Grisel, Fernando y Rafael; Comunidad Renacer, Familia Bautista, Familia Murcia, Familia Indekeu y Familia Mangandi: Gracias por compartir su vida y ser parte importante en mi Historia.

Al personal docente y administrativo que conforma la gran familia de la Facultad de Química y Farmacia: gracias por su sabiduría y trabajo que contribuye en la formación profesional de servidores de la salud en nuestro El Salvador.

Infinitas gracias y muchas Bendiciones.

Roger Bautista.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCION	
CAPITULO I: FUNDAMENTOS TEORICOS.	
1. MONOGRAFIA DE <i>Lippia graveolens</i> HBK	6
2. ASPECTOS GENERALES SOBRE DESINFECTANTES	
2.1 Definiciones.	14
2.2 Factores que influyen en la interacción del agente desinfectante y Microorganismo.	16
2.2.1 Concentración del agente desinfectante.	16
2.2.2 Tiempo.	17
2.2.3 pH.	17
2.2.4 Temperatura.	18
2.2.5 Naturaleza del microorganismo.	18
2.2.6 Presencia de materiales extraños.	19
2.3 Clasificación de los desinfectantes de acuerdo a su mecanismo de acción.	20
2.3.1 Agentes que lesionan la pared celular.	20
2.3.2 Agentes que desnaturalizan las proteínas.	23
2.3.3 Agentes que modifican los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos.	24
2.4. Evaluación de los desinfectantes.	25

2.4.1	Método del Coeficiente Fenólico.	26
2.4.2	Método de Kirby Bauer Modificado.	27
3.	GENERALIDADES DE LAS CEPAS MICROBIANAS UTILIZADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.	28
3.1	Bacterias Gram. positivas.	28
3.1.1	Identificación de cocos grampositivos aeróbios	29
3.1.1.1	<u>Staphylococcus</u> <u>sp</u>	31
3.1.2	Identificación de bacilos grampositivos.	33
3.1.2.1	<u>Bacillus</u> <u>subtillis</u>	33
4.	GENERALIDADES DEL EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA.	34
CAPITULO II: PARTE EXPERIMENTAL.		
1.	RECURSOS MATERIALES.	37
1.1	Reactivos.	37
1.2	Medios de Cultivo.	37
1.3	Material.	38
1.4	Equipo.	39
2.	METODOLOGIA.	40
2.1	Muestreo.	41
2.2	Diagnostico microbiológico del equipo de terapia respiratoria sometido a la acción sanitizante del Glutaraldehido al 2.00% ó	

Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%.	42
2.2.1 Obtención de las muestras.	42
2.2.2 Análisis de las muestras.	43
2.3 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del desinfectante a base de orégano por el método de Kirby Bauer modificado.	44
2.3.1 Preparación de los microorganismos de ensayo.	44
2.3.2 Realización del Método Kirby Bauer modificado.	45
2.3.3 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.)	46
2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante a base de orégano en la sanitización del equipo de terapia respiratoria	46
2.4.1 Limpieza y sanitización del equipo de terapia respiratoria.	46
2.4.2 Diagnostico microbiológico del equipo de terapia respiratoria.	47
2.4.2.1 Obtención de las muestras.	47
2.4.2.2 Análisis de las muestras.	48
i. Conteo de Bacterias Heterótrofas.	48
ii. Conteo de hongos, mohos y levaduras.	49
2.4.2.3 Identificación de bacterias resistentes al proceso de sanitización utilizando desinfectante formulado a base de orégano.	50

2.5	Control de calidad del desinfectante	
	formulado a base de orégano (<u>Lippia graveolens</u>).	51
2.5.1	Características físicas.	51
	i. Color.	51
	ii. Olor.	51
	iii. Transparencia.	51
	iv. pH.	52
2.5.2	Características químicas.	52
	Identificación del aceite esencial de	
	orégano por cromatografía de	
	capa fina.	52
CAPITULO III: CUADROS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.		
CUADRO No. 1: DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE LOS		
	EQUIPOS DE TERAPIA RESPIRATORIA	
	SOMETIDOS A LA ACCION SANITIZANTE	
	DEL GLUTARALDEHIDO AL 2.00%	
	ó CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%	55
CUADRO No. 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS		
	BACTERIANAS AISLADAS DE LOS EQUIPOS	
	DE TERAPIA RESPIRATORIA SOMETIDOS	
	A LA ACCION SANITIZANTE DEL	
	GLUTARALDEHIDO AL 2.00% ó	
	CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.	56

CUADRO No. 3:	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MINIMA (CIM) DEL DESINFECTANTE A BASE DE OREGANO (<u>Lippia graveolens</u>), POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.	57
CUADRO No. 4:	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DESINFECTANTE A BASE DE ORÉGANO. (<u>Lippia graveolens</u>) EN LA SANITIZACION DE LOS EQUIPOS DE TERAPIA RESPIRATORIA.	58
CUADRO No. 5:	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL DESINFECTANTE A BASE DE ORÉGANO (<u>Lippia graveolens</u>).	59
CUADRO No. 6:	CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL DESINFECTANTE A BASE DE ORÉGANO (<u>Lippia graveolens</u>)	60
	Análisis de resultados	61
CAPÍTULO IV:	CONCLUSIONES.	65
CAPÍTULO V:	RECOMENDACIONES.	70
	BIBLIOGRAFÍA.	74

ANEXOS.

ANEXO No. 1: FOTOGRAFIA DEL ORÉGANO (Lippia graveolens HBK.)

ANEXO No. 2: EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA.

ANEXO No. 3: TABLA II-A. PLANES DE MUESTREO SIMPLE
PARA INSPECCION NORMAL.

ANEXO No. 4: ESQUEMA DEL METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.

ANEXO No. 5: IDENTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO
(Lippia graveolens) POR CROMATOGRAFIA EN CAPA
FINA.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es evaluar la actividad antimicrobiana de un desinfectante a base de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*), en la sanitización de los equipos de terapia respiratoria de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Nacional de Niños "Benjamín Bloom".

Para el desarrollo de la investigación, fue necesario evaluar el actual proceso de sanitización implementado en el hospital, mediante la realización de un diagnóstico microbiológico de los equipos de terapia respiratoria, sanitizados con soluciones de Glutaraldehído al 2.00% para el caso de las válvulas de exhalación, y Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, para las máscaras ambulatorias, cámaras humidificadoras y tubos conectores corrugados. Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos realizados a los equipos indican la presencia de los siguientes microorganismos: *Bacillus subtilis* y cepas de *Staphylococcus sp.* Coagulasa negativos.

Utilizando los diferentes microorganismos aislados de los equipos de terapia respiratoria, se procedió a evaluar la efectividad del desinfectante a base de orégano, utilizando

para ello el método alterno de Kirby Bauer modificado. De esta forma, no sólo se verificó la inhibición en el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas, sino también se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del desinfectante en estudio, a 10.0 mg/mL, frente a los microorganismos de prueba.

Al evaluar el desinfectante a la Concentración Inhibitoria Mínima establecida, en la sanitización de los equipos de terapia respiratoria, los análisis microbiológicos realizados demuestran la eficacia del producto, al inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de hongos, mohos y levaduras; constituyendo así una alternativa válida para la prevención de neumonías neonatales asociadas al respirador, representante principal de las infecciones nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Nacional de Niños "Benjamín Bloom".

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales se han transformado en un problema que preocupa en gran medida a las autoridades nacionales e internacionales que velan por la salud; no sólo porque estas infecciones constituyen un riesgo de consideración, tanto para los pacientes hospitalizados como para el personal hospitalario; sino también, por ser un factor significativo con repercusiones sociales y económicas para la familia, sociedad y la institución misma.

Según la OPS, en el año 2001, el Hospital Nacional de Niños "Benjamín Bloom" asignó alrededor de un 13.0% de su presupuesto para el tratamiento de infecciones intrahospitalarias; del cual un 50.0% fue destinado al tratamiento de neumonías neonatales asociadas al respirador. El compromiso de las autoridades del hospital en incrementar la vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales, apunta hacia la ejecución de acciones efectivas destinadas no sólo a la detección de gérmenes y los puntos críticos de contaminación; sino también, a la adopción de medidas relacionadas con la preservación y descontaminación del ambiente físico, salas, quirófanos y equipo de uso hospitalario, entre otras.

El empleo de especialidades químicas que garanticen un proceso de limpieza y sanitización en los equipos de terapia respiratoria, resulta imprescindible y de gran importancia en la prevención por infecciones nosocomiales; sin embargo, dada la capacidad de los microorganismos de adquirir resistencia a las diferentes sustancias utilizadas, se hacen necesarias las investigaciones encaminadas al desarrollo y evaluación de nuevos preparados químicos con amplia capacidad microbiocida.

Investigaciones recientes han demostrado la capacidad antimicrobiana de los extractos y aceite esencial obtenidos a partir del orégano (*Lippia graveolens*), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Candida albicans*. Dichos resultados condujeron a la investigadora salvadoreña Rina Toledo a formular y desarrollar un desinfectante a base de orégano, en respuesta a la necesidad de prevenir las infecciones nosocomiales, con el firme objetivo de asegurar su implementación en los procesos de sanitización de equipos y material hospitalario.

Así, la evaluación de la actividad antimicrobiana de un desinfectante a base de orégano(*Lippia graveolens*), en la sanitización de los equipos de terapia respiratoria empleados

en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Nacional de Niños "Benjamín Bloom", pretende que los resultados arrojados por esta investigación, contribuyan en la prevención y erradicación de las infecciones nosocomiales en dicho centro de salud pública.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. MONOGRAFIA DEL OREGANO (Lippia graveolens) HBK

NOMBRE CIENTIFICO: Lippia graveolens

NOMBRE COMUN: Orégano

SINONIMOS: Lantana origanoides,
Lantana berlandieri
Goniostchyum graveolens.

FAMILIA: Verbanaceae.

DESCRIPCION BOTANICA

La Lippia graveolens es un arbusto delgado de hasta 2 m de alto, ramas con pubescencia cortamente pilosa. Hojas pecioladas de 5-10 mm de largo, de oblongas a elípticas, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas, suaves al tacto, densamente tomentosas y muy aromáticas. Flores subglobulosas a oblongas de 4-12 mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas, cáliz glandular de 1-2 mm de largo y corola blanca de 3-6 mm de largo. Tiene una flor blanca y bien fina y la semilla es tan fina como la del tabaco. La hoja se puede secar y guardar; entre más seca, más fuerte es el olor.⁴

HABITAT

Lippia graveolens es nativa del sur de Texas hasta Nicaragua. Se le encuentra en bosques secos y montes espinosos

subtropicales; en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies hasta 350 msnm.⁴

En El Salvador se encuentran cultivos orgánicos de este arbusto, en el campo experimental de APROCSAL en la comunidad El Pacún, departamento de San Vicente.

HISTORIA.

Con el nombre de orégano se conoce más de 53 plantas de diferentes especies e incluso familias, que por sus aceites esenciales de aromas parecidos han sido usados indistintamente.

Lippia graveolens es usado con fines culinarios y medicinales desde los tiempos de los griegos y romanos; Plinio recomendaba los cataplasmas para tratar picaduras de escorpiones; Dioscórides en el Siglo I y Gerard en el Siglo XVI describen varias especies de oréganos medicinales; según Culpeper su actividad está regida por Mercurio.⁴

AGRICULTURA.

Lippia graveolens es principalmente recolectada en sus lugares de crecimiento silvestre, se recomienda su manejo y siembra comercial para garantizar su aprovisionamiento sostenido. Se

propaga por semilla o estaca de madera suave. Las hojas se colectan en plena floración y se secan a la sombra.⁴

COMPOSICION QUIMICA

El tamizaje fitoquímico de hojas de Lippia graveolens contiene; aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol.

El fraccionamiento bioguiado del extracto metanólico con actividad antimicrobiana, demuestra en la fracción activa la presencia de flavonas y glicósidos iridoides, identificados como ácido carioptosídico y lipósido I y II respectivamente.

El aceite esencial de Lippia graveolens tiene densidad 0.890 - 0.922, índice de refracción 1.479-1.498. Contiene Timol (40-60%), p-Cimeno (7.7-9.2%), 1,8-Cineol (4.5-4.8%), Carvacrol (3.1-21%), Mirceno (0.9-2.5%), Δ 3-careno (0.9-1.5%), Cariofileno (0.8-1.2%), Linalool (0.7-1.3%), α - Terpeneol (3.1-3.9%) y al menos 34 elementos más en menores cantidades.⁷

ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas de Lippia graveolens es activa contra Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa, Salmonella typhi, S. flexneri, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae y Streptococcus pyogenes, pero inactiva contra H. influenzae; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos.^{4, 7.}

Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra Candida albicans, A. flavus, E. floccosum, M. gypseum y T. rubrum, pero inactivos contra C. neoformans. La CIM del extracto diclorometánico contra bacterias es 10 mg/mL y del etanol es 1.75 mg/mL; la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la actividad contra M. gypseum es 2.5 mg/mL.^{4, 7}

El aceite esencial de Lippia graveolens presentan una elevada toxicidad sobre Artemia salina con una Concentración Letal 50 (LC₅₀) de 27.15 mg/mL debido a la presencia de Linalool y Carvacrol que actúan de forma sinérgica causando destrucción celular.⁸

Estudios recientes han demostrado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Lippia graveolens, contra la levadura Cándida albicans y las bacterias Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis y Salmonella typhi con una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 0.25 mg/mL.²

El aceite esencial inhibe el crecimiento de Escherichia coli y también la placa bacteriana de la cavidad oral.¹⁵

FARMACOGNOSIA.

La parte medicinal son las hojas y las unidades floridas secas, que deben reunir las mismas características fisicoquímicas y sanitarias de la materia prima usada para la elaboración de productos fitofarmacéuticos.^{4, 7}

De acuerdo a la Ecopharm Hellas, los siguientes compuestos presentes en el aceite esencial de orégano, reportan actividad farmacognósica en forma aislada y en determinadas dosis de laboratorio, las cuales son mayores a las concentraciones reales presentes en la planta; por lo cual su actividad individual no refleja la actividad farmacognósica de la planta en estudio.¹⁸

Linalool: No se reporta actividad.

α -Terpineol: Antiasmático, antiséptico, bacteriostático, antibacterial, funguicida e irritante.

Timol: Antibacterial, candidacida, antiséptico urinario, irritante y funguicida.

USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS.

La decocción o infusión de hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento, indigestión) y respiratorias (asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis, pleuresia, resfrío, tosferina, tuberculosis); hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo.

La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas secas se usa para tratar diabetes, disentería y catarro. En homeopatía se usa para condiciones histéricas.⁴

Tópicamente la decocción se aplica para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta; en baños se usa para fortalecer niños y niñas en estado de debilidad, combatir la gripe y para aliviar el prurito y la sarna; en cataplasma para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar

induraciones, cáncer y tumores; en fricciones y baños se usa como calmante.⁴

La planta fresca macerada en aceite se aplica para contrarrestar los dolores reumáticos; la maceración alcohólica contra ataques epilépticos. Se le atribuye propiedad antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamatoria, diaforética, digestiva, diurética, emenagoga, espamolítica, estimulante, estomática, expectorante, pectoral, sudorífica y tónica.⁴

OTROS USOS POPULARES.

Por su sabor, aroma y valor nutritivo las hojas secas se usan para sazonar carne, pescado, embutidos, ensaladas, guacamol, pozol, salsas y licores; además se usa como planta de jardín, aromática, cosmética y para preparar arreglos florales.⁴

El aceite esencial tiene uso en perfumería, jabonería y cosmética. Las semillas se utilizan para extracción industrial de ácidos grasos, con un rendimiento de 29.20%.⁴



© 2001, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

TOXICOLOGIA.

Los extractos acuosos y etanólicos de hojas de Lippia graveolens 500 ppm, presentan cierta toxicidad dosis dependiente contra peces del género Mollinesia.⁴

La administración de los extractos durante el embarazo está contraindicado, ya que puede producir aborto.⁴

El lapachenol tiene actividad carcinogénica y podría explicar cierta actividad antifertilidad atribuida. La DL₅₀ del carvacrol por vía oral en conejos es 100 mg/kg.⁴

Algunas especies del género Origanum pueden interrumpir el embarazo en cobayos e inhibir la implantación en ratas, ratones y hámster.⁴

PLANTAS CON LAS QUE SE PUEDE COMBINAR.

Como antiséptico: Eucalipto, nance, tomillo y zarzaparrilla.

Como digestivo: Anís, hierbabuena, manzanilla y pericón.

Como emenagoga: Borraja, manzanilla, milenrama y ruda.

Como expectorante: Hierbabuena, eucalipto, marrubio y sauco.

2. ASPECTOS GENERALES SOBRE DESINFECTANTES.

2.1 DEFINICIONES.^{10, 11.}

La muerte de las células bacterianas o la prevención de su multiplicación mediante la utilización de agentes químicos en los equipos de uso hospitalario, es un aspecto importante en la vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales en los centros de asistencia hospitalaria; razón por la cual es necesario establecer la diferencia en los siguientes términos, para comprender las funciones que dichos agentes llevan a cabo.

i. Asepsia: Es cualquier proceso que impida o combata la infección o la sepsis (crecimiento de bacterias patógenas en tejidos vivos) matando o inhibiendo a los microorganismos.

ii. Esterilización: Se define como la utilización de procedimientos físico y químicos para la destrucción de toda vida microbiana, incluyendo grandes cantidades de endosporas altamente resistentes (Bacillus subtilis, Clostridium sporogenes). En hospitales esta definición se aplica a la destrucción de microorganismos que viven sobre objetos inanimados. Los métodos más utilizados para la esterilización son: calor húmedo, Óxido de

Etileno (gas) y calor seco. También existen germicidas químicos que utilizados adecuadamente pueden ayudar grandemente en el proceso de esterilización, ejemplo: el Glutaraldehido para esterilizar endoscopios e instrumentos quirúrgicos.

iii. Descontaminación: Es el término utilizado para describir un proceso o tratamiento que le permite a un aparato, instrumento o superficie ser utilizado con seguridad.

iv. Desinfección: Comprende los procesos implicados en la destrucción de la mayoría de microorganismos presentes en superficies y equipos, pero no necesariamente las esporas bacterianas. Por definición, este proceso no asegura una destrucción total de la vida microbiana, y por lo tanto desinfección es un proceso que está por debajo de los niveles de seguridad alcanzados por la esterilización.

v. Desinfectante: Es cualquier agente o producto químico que mata los microorganismos patógenos, pero no necesariamente las esporas bacterianas, y se aplica a preparados que se emplean sobre objetos inanimados.

vi. Antiséptico: Es definido como germicida que puede ser utilizado sobre la piel o algún tejido con el propósito de destruir o inhibir microorganismos.

vii. Sanitización: Es el término útil para indicar el dejar objetos libres de gérmenes patógenos y estéticamente limpios en cuanto a material orgánico se refiere. Este término se ha aplicado a los procesos utilizados en restaurantes, industria farmacéutica y de alimentos, entre otros establecimientos, donde posterior a la limpieza de mesas de trabajo, equipos, etc. deben utilizarse productos químicos que no dejan residuos pero sí matan bacterias.

viii. Funguicida: Agente químico que bajo condiciones definidas destruye levaduras, mohos y sus esporas.

2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA INTERACCION ENTRE EL AGENTE DESINFECTANTE Y EL MICROORGANISMO.

La efectividad de un agente desinfectante en particular esta determinada en gran medida por las condiciones siguientes: ⁶

2.2.1 Concentración del agente desinfectante.

Muchos agentes son letales para la bacteria sólo cuando se

utilizan en concentraciones extremadamente elevadas. Otros desinfectantes pueden estimular, retardar o incluso destruir microorganismos en concentraciones más bajas.

Muchos de los compuestos químicos que son letales para las bacterias presentan un efecto bacteriostático en concentraciones más bajas. También se observa una notable tendencia con los agentes tóxicos para estimular procesos biológicos cuando se emplean en bajas concentraciones. Sin embargo la concentración requerida para producir un efecto dado, así como el espectro de concentración con el cual es demostrable, varía con el desinfectante, el microorganismo y el método de prueba.

2.2.2 Tiempo.

Cuando se exponen bacterias a una concentración específica de un agente bactericida, incluso en exceso, no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo, sino que hay una disminución gradual en el número de células vivientes.

Habitualmente, la desinfección se considera un proceso en el cual las bacterias son destruidas durante un lapso de tiempo razonable.

2.2.3 pH.

La concentración de iones hidrógeno influye sobre la acción bactericida, afectando tanto al microorganismo como al agente químico.

Cuando se suspenden en un medio de cultivo las bacterias están negativamente cargadas; un aumento del pH incrementa la carga y puede alterar la concentración efectiva del agente químico en la superficie de la célula. El pH también determina el grado de ionización del agente. En general, la forma no ionizada de un agente disociable pasa a través de la membrana celular más fácilmente que las formas iónicas relativamente inactivas.

2.2.4 Temperatura.

La destrucción de bacterias por agentes químicos, como otras reacciones cinéticas, es directamente proporcional al aumento en la temperatura. Por cada 10 grados Celsius de incremento de temperatura, la tasa de mortalidad se duplica.

2.2.5 Naturaleza del microorganismo.

La eficacia de un agente en particular depende de las propiedades del microorganismo contra el cual está siendo probado. Las más importantes son las especies de

microorganismos, la fase de crecimiento del cultivo, la presencia de estructuras especiales como esporas o cápsulas, los antecedentes del cultivo y el número de microorganismos en el sistema de pruebas.

2.2.6 Presencia de materiales extraños.

La presencia de materia orgánica como suero, sangre o pus, influye en la actividad de muchos desinfectantes y hace inertes sustancias que son altamente activas en su ausencia. Estos materiales extraños alteran la actividad desinfectante de diversas formas: Adsorción del desinfectante en superficies por coloides proteicos, con la formación de un compuesto químicamente inerte o inactivo y la unión del desinfectante a grupos activos de una proteína extraña.

Entre los desinfectantes cuya actividad inhibitoria disminuye enormemente por la presencia de material orgánico con alto contenido proteico se encuentran las anilinas mercuriales y los detergentes catiónicos. Los mercuriales se ven notablemente inhibidos por compuestos que contienen grupos sulfidrilos y los compuestos de amonio cuaternario son inhibidos por jabones y lípidos.

2.3 CLASIFICACION DE LOS DESINFECTANTES DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCION⁸.

Los mecanismos por los cuales las sustancias desinfectantes destruyen o inhiben el crecimiento de los microorganismos son variados y complejos. Sin embargo, en general todos los efectos observables de los desinfectantes sobre las bacterias son resultado de cambios en sus componentes macromoleculares.

Basándonos en lo anterior podemos clasificar a los desinfectantes de la siguiente forma:

2.3.1 Agentes que lesionan la membrana celular.

La membrana celular separa el protoplasma viviente del medio ambiente no viviente y regula el flujo de solutos hacia y desde la célula.

La integridad estructural de la membrana depende de la ordenada disposición de las proteínas y lípidos que la componen. La exposición de los microorganismos a solventes y detergentes orgánicos da como resultado una desorganización estructural de la membrana e interferencia con la función normal de la misma. Entre éstos tenemos:

Desinfectantes con actividad superficial.

Conocidos también con el nombre de agentes tensoactivos, los cuales son sustancias que alteran las relaciones energéticas a nivel de las interfases, produciendo una reducción de la tensión interfásica de la superficie. Son compuestos que poseen grupos que atraen el agua (hidrófilos) y que la repelen (hidrófobos). La interfase entre la membrana que contiene lípidos de una célula bacteriana y el medio acuoso circundante proporciona un blanco susceptible para los agentes de este tipo. La porción hidrófoba de la molécula es un hidrocarburo de cadena larga liposoluble mientras que la porción hidrófila puede ser un grupo ionizable o una estructura no iónica pero altamente polar, entre los que se incluyen:

i. Sustancias catiónicas: Compuestos de amonio cuaternario. Cuando las bacterias son expuestas a agentes de este tipo, el grupo positivamente cargado se asocia a grupos fosfatos de los fosfolípidos de la membrana, mientras la porción no polar penetra hacia el interior hidrófobo de la membrana produciendo una pérdida de la semipermeabilidad de la membrana y filtración desde la célula, de nitrógeno y compuestos que contienen

fósforo. Entonces el propio agente puede ingresar en la célula y desnaturalizar sus proteínas.

ii. Sustancias aniónicas: Los detergentes aniónicos provocan una grosera disociación de la estructura lipoprotéica de la membrana celular, permitiendo que enzimas autolíticas actúen sobre sustratos que no disponen las células intactas. Cuando se emplean en conjunto los detergentes catiónicos y aniónicos se neutralizan unos a otros.

iii. Sustancias no iónicas: Presentan un efecto solubilizante no específico sobre la membrana citoplasmática que separa selectivamente las proteínas de la pared y membrana celular.

iv. Sustancias anfóteras: No ha sido aún determinado el mecanismo de acción de estas sustancias, ya que continúa siendo tema de controversia la efectividad de este grupo de agentes, a pesar de los informes de que es igualmente efectiva que los amonios cuaternarios catiónicos.

v. Compuestos fenólicos: Estos compuestos provocan la lesión de la membrana con filtración del contenido celular y lisis.

Con bajas concentraciones que son rápidamente bactericidas, las oxidasas y deshidrogenasas unidas a la membrana se inactivan en forma irreversible.

vi. Alcoholes: Desorganizan la estructura lipídica penetrando en la región hidrocarbonada. Además de su efecto sobre la membrana celular, los alcoholes y otros solventes orgánicos también desnaturalizan las proteínas celulares.

2.3.2 Agentes que desnaturalizan las proteínas.

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en una célula bacteriana, y son fundamentales para todos los aspectos de la estructura y función de la célula. Los agentes que alteran la configuración de una proteína por desnaturalización, provocan un desdoblamiento de la célula polipeptídica de forma tal que las cadenas aparecen enrolladas al azar y en forma irregular.

Entre los agentes químicos que desnaturalizan las proteínas celulares están:

Ácidos y álcalis: Estos agentes ejercen su actividad antibacteriana a través de sus iones hidrógenos y oxidrilos libres a través de moléculas no disociadas o alterando el pH del medio ambiente del microorganismo.

2.3.3 Agentes que modifican los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos.

El sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen con el sustrato e inician los eventos catalíticos. Se produce una inhibición de la actividad enzimática si uno o más de estos grupos funcionales es alterado o destruido. Entre los agentes químicos que modifican los grupos funcionales de las células tenemos:

i. Metales Pesados: Las sales solubles de mercurio, arsénico, plata y otros metales pesados, alteran la actividad enzimática formando mercaptanos con grupos sulfidrilos de residuos de cisteína.

ii. Agentes antioxidantes: Los agentes antimicrobianos más útiles en este grupo son los halógenos y el peróxido

de hidrógeno. Inactivan las enzimas convirtiendo los grupos -SH funcionales en forma S-S oxidada. Los agentes más fuertes atacan grupos amino, indol y el grupo hidroxifenólico de la tirosina.

iii. Tinturas: Presentan una notable afinidad por grupos fosfatos acíclicos de las nucleoproteínas y otros componentes celulares.

iv. Agentes alquilantes: Los efectos letales del formaldehído, óxido de etileno y Glutaraldehído son resultado de su acción alquilante sobre las proteínas. Las inhibiciones producidas por tales agentes son irreversibles, dando como resultado la modificación e inhibición de la actividad enzimática.

2.4 EVALUACION DE LOS DESINFECTANTES.^{5,6}

Según la AOAC, existen dos métodos oficiales de análisis para evaluar la actividad microbiológica de los desinfectantes:⁶

i. Método de coeficiente Fenólico

ii. Método de Kirby Bauer modificado.

2.4.1 Coeficiente Fenólico.

La relativa eficacia bactericida de los desinfectantes químicos tiene gran importancia práctica. La investigación experimental logró establecer una técnica estandarizada que permite establecer el poder bactericida de un compuesto químico determinado en comparación con el fenol. El valor numérico obtenido se denomina coeficiente Fenólico e indica que el producto estudiado es bastante aproximado, mayor o menor germicida que el fenol; por lo que se han desarrollado métodos estándar para determinar el Coeficiente Fenólico.

El efecto de la materia orgánica extraña sobre el poder bactericida de un desinfectante suele tomarse muy en cuenta, efectuando la prueba con y sin la adición de materia orgánica. Es importante señalar que las bacterias difieren mucho en su resistencia al fenol; de manera que se necesita precisión para especificar el coeficiente Fenólico.

El dato del coeficiente Fenólico, en cuanto a actividad antimicrobiana, tiene varias limitaciones, incluyendo el de no valorar los efectos de la concentración, coeficiente de la temperatura y otros. En consecuencia, se han usado variantes de la técnica, por ejemplo, se ha estudiado la prueba de concentración germicida equivalente para valorar la capacidad letal de sustancias inestables como los hipocloritos. Se

mide la supervivencia después de pequeños intervalos de exposición al hipoclorito y al desinfectante desconocido. Se determinan las concentraciones que tienen la misma capacidad destructora de las bacterias así como los de un compuesto de referencia.

2.4.2 Método Alternativo de Kirby Bauer Modificado.

Es el método de difusión por discos descrito por primera vez en 1966. Está actualmente bien estandarizado y ha sido objeto de amplias evaluaciones; con algunas modificaciones se utiliza en el estudio de eficacia de desinfectantes como un método alternativo al del Coeficiente Fenólico. Ahora no se utilizan discos de antibióticos sino cilindros de acero inoxidable en los cuales se colocan las diluciones de los desinfectantes a ser analizados.

Este método consiste en medir el halo de inhibición producido por un desinfectante o un antiséptico preparado a una concentración determinada, al difundirse sobre la superficie del medio sólido cubierta con el microorganismo de prueba y compararlo con el halo de inhibición producido por una solución de Yodo. Así, este método permite determinar la Concentración Inhibitoria Mínima del desinfectante en estudio al verificar que el halo de inhibición producido por el

desinfectante sea mayor al halo de inhibición producido por la solución de Yodo.

3. GENERALIDADES DE LAS CEPAS MICROBIANAS UTILIZADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.¹¹

3.1 Bacterias Grampositivas.

Las bacterias grampositivas tienen una serie de características que ayudan a distinguirlas de los microorganismos gramnegativos. De capital importancia es el alto contenido de peptidoglicano y el bajo tenor lipídico de su pared celular, con relación a los microorganismos gramnegativos. Los alcoholes y otros solventes orgánicos no penetran la pared celular pobre en lípidos de las bacterias grampositivas. Así, los microorganismos grampositivos retienen el colorante cristal violeta. También resisten la acción germicida de agentes activos en superficie, como jabones, detergentes y fenoles.¹¹

Estos gérmenes por lo general son más resistentes que los gramnegativos a la desecación, al aumento de temperatura, la luz solar y a la acción lítica de varios agentes químicos.¹¹

Las bacterias grampositivas son de naturaleza ubicua y su hábitat natural incluyen la piel y las membranas mucosas de

humanos y animales. Algunas especies se recuperan en forma regular de la suciedad y el polvo de pisos y paredes y de una variedad de objetos inanimados. En el hombre, las infecciones se transmiten por contacto directo con personas infectadas o por la penetración de piel y mucosas con objetos contaminados que poseen superficies afiladas o puntiagudas, como los asociados con heridas traumáticas o procedimientos quirúrgicos.¹¹

3.1.1 Identificación de Cocos Grampositivos Aeróbios.

Los cocos grampositivos son los microorganismos que con mayor frecuencia se asocian con infecciones humanas.¹¹

Los cocos grampositivos aerobios crecen bastante bien en medios de aislamiento no selectivos convencionales, especialmente agar-sangre. Los cocos grampositivos son inhibidos en los medios selectivos, como agar de MacConkey, agar-eosina-azul de metileno (EMB) y agar-Salmonella-Shigella (SS), que contienen cristal violeta, colorante inhibitorio de estos microorganismos. Las sales biliares, presentes en medios de agar diferenciales y selectivos para bacterias entéricas gramnegativas, también suprimen el crecimiento de bacterias grampositivas.¹¹

La primera consideración práctica de laboratorio es si un aislamiento recuperado de una muestra es un coco grampositivo, y de ser así, si es un *Staphylococcus* o un *Streptococcus*. La aparición de colonias en agar-sangre, con ausencia de colonias en agar de MacConkey o agar-azul de metileno-eosina (EMB) constituye un dato inicial de que el microorganismo en cuestión es grampositivo.¹¹

Una preparación con coloración de Gram. de una colonia sospechosa en cultivo de agar o caldo posteriormente puede confirmar la identificación presuntiva. Los cocos grampositivos retienen el colorante cristal violeta después de la decoloración y se les ve como esferas azul oscuro en las preparaciones con tinción de Gram. Si esta tinción se realiza durante la fase de retardo del crecimiento, cuando aún no hay actividad metabólica, en la fase estacionaria o en estadios tardíos, cuando es posible en presencia de formas no visibles, la tinción puede ser variable. Estas células metabólicamente inactivas o células muertas no retienen el cristal violeta y aparecen como gramnegativas (rosa a rojo) y, posiblemente, más pequeñas o más grandes que las células grampositivas viables. Si las células tienden a formar tétradas o cúmulos en forma de racimos en un medio líquido, debe sospecharse la presencia de *Staphylococcus*; los

Streptococcus, que se dividen en un plano más que en tres, tienen tendencia a formar cadenas en medio líquido.¹¹

3.1.1.1 Staphylococcus sp.

Las colonias de Staphylococcus en general no son difíciles de reconocer cuando crecen en agar. La mayoría de las especies forman colonias relativamente grandes, de 2-3 mm., después de 24 horas de incubación a 35°C, o hasta de 7 mm después de 48 a 72 horas de incubación. Algunas cepas de Staphylococcus coagulasa negativos (por Ej., S. capitis) y las llamadas colonias "enanas" de S. aureus, son excepciones. Variantes de colonias pequeñas pueden ser confundidas con ciertos Streptococcus, los cuales se diferencian fácilmente mediante la prueba de catalasa.¹¹

La mayor parte de las colonias de Staphylococcus son opacas y convexas, tienen consistencia cremosa y son blancas o muestran una variada gama de tonos amarillos, en particular después de una incubación prolongada o de permanecer a temperatura ambiente durante varios días. Cuando crecen en agar-sangre, algunas cepas producen β -hemólisis; la proporción del diámetro de las colonias con respecto a la zona hemolítica es mayor que para las colonias pequeñas o puntiformes de Streptococcus.¹¹

Una vez que la colonia de un medio de aislamiento primario ha sido reconocida como un posible *Staphylococcus*, sobre la base de su morfología, características de crecimiento y una prueba de catalasa positiva, la segunda consideración es diferenciar a los *S. aureus* de los *Staphylococcus* coagulasa negativos como *S. saprophyticus*, agente significativo de infecciones del tracto urinario, y *S. epidermidis*.

El *S. aureus* es la única especie staphylocócica humana que produce coagulasa, enzima asociada con infecciones humanas. La producción de coagulasa y la β -hemólisis son dos características estrechamente relacionadas con *S. aureus*, aunque la primera es más confiable. Además, la capacidad de algunas cepas de *S. aureus* y de *S. saprophyticus*, pero no de *S. epidermidis*, de fermentar manitol es una característica taxonómica importante.¹¹ La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus*, en contraste con *S. epidermidis* y la mayoría de los otros *Staphylococcus* coagulasa-negativos, pueden fermentar manitol y formar ácido. Un medio excelente para la recuperación de *Staphylococcus* patógenos de poblaciones bacterianas mixtas es el agar-manitol salado. Este medio toma ventaja de la capacidad de los *Staphylococcus* de crecer en presencia de 7.5% de cloruro de sodio y de la capacidad del *Staphylococcus aureus* de fermentar el manitol,

en el medio rojo anaranjado y producir colonias con halo amarillo, indicando la producción de ácido.¹¹

3.1.2 Identificación de Bacilos Grampositivos.

Al igual que los cocos grampositivos éstas presentan idénticas características de crecimiento en medios de aislamiento no selectivos, especialmente agar-sangre; siendo las características morfológicas microscópicas, las únicas que permiten su diferenciación.

3.1.2.1 Bacillus subtilis.²

Bacilos aerobios grampositivos formadores de esporas, son oblicuos, debido a que forman esporas que pueden sobrevivir en el ambiente muchos años. Prevalecen en el suelo, agua y sobre vegetales diversos. El Bacillus subtilis puede en ocasiones producir enfermedades a personas que padecen de alteraciones inmunitarias, por ejemplo meningitis, endocarditis, conjuntivitis o gastroenteritis. Las células miden 1 x 3 y hasta 4 µm, poseen terminaciones cuadradas y están dispuestas en cadenas largas, las esporas se encuentran en el centro de los bacilos inmóviles. Utiliza fuentes de nitrógeno y de carbono sencillas, tanto para obtener energía como para el crecimiento. Las esporas son resistentes a los cambios del ambiente, soportando el calor seco y diversos

desinfectantes químicos durante períodos moderados, persisten durante años en la tierra seca.²

4. GENERALIDADES DEL EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA.

Los equipos de terapia respiratoria son instrumentos médicos sofisticados utilizados para la administración de oxígeno, aerosoles o anestésicos en pacientes. Cada equipo consta de las siguientes partes:

4.1 Ventilador mecánico.

Controlador periódico de los fluidos procedentes de las fuentes de aire y Oxígeno. Consta de dos sistemas de control: el microprocesador, que controla los tiempos de respiración y expiración, y el sistema de control de fluidos, que se encarga de la presión de inspiración y expiración.

4.2 Sistema de humidificación térmica.

Constituido por el humidificador y la cámara humidificadora, encargados de calentar y humedecer el fluido procedentes del ventilador hasta alcanzar valores fisiológicos, respectivamente.

4.3 Circuitos conectores.

Consta de tres líneas: vía inspiratoria y vía exhalatoria, quienes utilizan tubos conectores corrugados; y la vía aérea artificial que utiliza tubos conectores lisos para el monitoreo de presiones.

4.4 Sistema de Oxígeno - Aerosol Terapia.

Constituido por máscaras o cánulas que se encuentran en contacto con la cavidad oral y/o nasal del paciente respectivamente.

4.5 Válvula de exhalación.

Que es el principal componente activo que controla las presiones generadas por el paciente.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1. RECURSOS MATERIALES

1.1 REACTIVOS.

Acetato de Etilo.

Ácido Sulfúrico 5% en Etanol.

Ácido Tartárico.

Alcohol Isopropílico.

Etanol 90.

Indicador Rojo de Metilo.

Solución Cristal Violeta.

Solución de Lugol.

Solución de Peróxido de Hidrógeno.

Solución de Safranina.

Solución de 20.0 mg/mL de Yodo.

Tolueno.

Vainillina 1% en Etanol.

1.2 MEDIOS DE CULTIVO.

Agar Citrato.

Agar McConkey.

Agar Müeller Hinton.

Agar Papa Dextrosa.

Agar Plate Count.

Agar Sangre base.

Agar SIM.

Agar Tres Azúcares y hierro (TSI)

Agar Tripticasa Soya.

Caldo Manitol.

Caldo Rojo de metilo - Vogues Proskauer.

Caldo Tripticasa Soya.

Caldo Triptona.

Plasma sanguíneo.

1.3 MATERIAL.

Agitadores magnéticos.

Agitadores de vidrio.

Asas bacteriológicas de platino de 3.0 mm.

Cajas de petri de 65x65 mm.

Cámara cromatográfica.

Cilindros de acero inoxidable de 6.0 + 0.1 mm de diámetro interior por 0.8 + 0.1 mm de largo.

Espátulas.

Erlenmeyers de 500 y 2000 cc.

Gradillas.

Hisopos estériles.

Medidor de halos de inhibición.

Papel Kraft.

Pipetas de Mohr de 10 cc.

Pipetas Pasteur.

Pipetas volumétricas de 1, 5, 10 y 25 cc.

Placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 prefabricadas (Merck).

Termómetros.

Torundas de algodón.

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 x 125 mm.

Vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 cc.

1.4 EQUIPO.

Autoclave Webeco.com Schwartau tipo C.

Balanza granataria Ohaus, modelo 3201

Contador de colonias Leica Quebec, Darkfield, modelo 3325.

Estufa Precision, modelo 25EG.

Incubadora Napco, modelo 332.

Hielera Rubbermade.

Mechero Bunsen marca: Fisher.

Microscopio Nikok YS2-T, modelo 181040.

pH metro Orion, modelo Perphect 310.

Refrigeradora Cetron, modelo 2907.

Stirring - Hot plate, Fisher, modelo 11-500-7SH.

2. METODOLOGIA.

Una vez realizado el control de calidad del desinfectante en estudio(apartado 2.5 de este capítulo), la metodología analítica se divide en tres partes:

- i. Un diagnóstico microbiológico de los equipos de terapia respiratoria: que busca identificar y aislar los microorganismos resistentes al Glutaraldehido 2.00% utilizado para la sanitización de las válvulas de exhalación, y la solución de Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, utilizada en la desinfección de las máscaras ambulatorias, tubos conectores corrugados y cámaras humidificadoras.
- ii. La determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima del desinfectante a base de orégano por el método de Kirby Bauer modificado, utilizando para ello los microorganismos aislados anteriormente.
- iii. La evaluación microbiológica de la sanitización de los equipos de terapia respiratoria utilizando el desinfectante a base de orégano a la Concentración Inhibitoria Mínima establecida.

2.1 MUESTREO

Para evaluar la efectividad de los desinfectantes: Glutaraldehido 2.00%, Clorhexidina 1.50% + Cetrimide 15.0% y aceite esencial de Lippia graveolens, en la sanitización microbiológica de los 15 equipos de terapia respiratoria con los que cuenta la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital Nacional de Niños "Benjamín Bloom", es necesario realizar una inspección normal por muestreo, tomando como referencia la norma centroamericana del ICAITI 4011: "Procedimientos de Muestreo por atributos y tablas para inspección por atributos. Planes de muestra simple, doble y múltiple con rechazo".

Según la normativa, debe realizarse un plan de muestreo simple; el cual, una vez definido el nivel de calidad aceptable de 1.0, requiere una muestra equivalente a tres equipos, según la Tabla II-A: Planes de muestreo simple para inspección normal (Anexo No. 3).

A los tres equipos seleccionados aleatoriamente se les realiza un diagnóstico microbiológico, tomando muestras de las siguientes partes: máscara ambulatoria, tubos corrugados, cámara humidificadora y válvula de exhalación, expuestas primero a las soluciones de Glutaraldehido al 2.00% ó

Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, con el objetivo de determinar los microorganismos que han generado resistencia a su acción sanitizante; y luego con el desinfectante a base de orégano (*Lippia graveolens*), una vez determinada su Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), para comprobar su eficacia en la inhibición de microorganismos.

2.2 DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO DEL EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA SOMETIDO A LA ACCIÓN SANITIZANTE DEL GLUTARALDEHIDO AL 2.00% Ó CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.

2.2.1 Obtención de las muestras.

A cada uno de los tres equipos de terapia respiratoria seleccionados, realizar los siguientes muestreos:

Muestreo de mascarillas ambulatorias.

Con un hisopo estéril humedecido con caldo Tripticasa Soya, frotar las superficies internas de las mascarillas ambulatorias. Depositar el hisopo en tubos de ensayo conteniendo el mismo medio de cultivo y transportar al laboratorio para su posterior análisis.

Muestreo de las cámaras humidificadoras y válvulas de exhalación.

Por separado, sumergir dichas partes en caldo Tripticasa Soya estéril por treinta minutos. Extraer las partes con pinzas estériles, tapar los frascos y transportar al laboratorio, para su posterior análisis.

Muestreo de tubos conectores.

Verter 50.0 mL de caldo Tripticasa Soya por cada tubo conector. Recolectar el caldo vertido en un frasco estéril de boca ancha y transportar los frascos al laboratorio para la realización de análisis posteriores.

2.2.2 Análisis de las muestras.

Para todas las muestras tomadas, incubar los frascos a 37° C por 24 horas y en los casos donde el caldo Tripticasa Soya incubado presente turbidez, inocular con un asa bacteriológica por el método de estrías, placas conteniendo Agar McConkey y Agar sangre estériles e incubar a 37°C por 24 horas.

Hacer un frotis por cada una de los diferentes tipos de colonias desarrolladas en las placas anteriores y observar al microscopio su comportamiento a la tinción al Gram.

De los resultados observados en la coloración al Gram, realizar pruebas bioquímicas (IMViC) para bacterias Gramnegativas y pruebas de coagulasa, catalasa y manitol para bacterias Grampositivas. Reportar las cepas bacterianas identificadas.

2.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM) DEL DESINFECTANTE A BASE DE OREGANO POR EL METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.

2.3.1 Preparación de los microorganismos de ensayo.

Por cada cepa bacteriana aislada e identificada, inocular un tubo conteniendo 10.0 cc de Caldo Tripticasa Soya estéril e incubar a 37° C por 24 horas.

Tomar un inóculo y transferir a un tubo conteniendo agar Tripticasa Soya inclinado estéril e incubar a 37° C por 24 horas.

Repetir este proceso por cinco días, cada 24 horas, para lograr la fase de crecimiento logarítmica de las bacterias. Transcurrido este tiempo, de cada cepa bacteriana aislada en Agar Tripticasa Soya inclinado, tomar un inóculo, utilizando una asa de platino estéril, y transferirlo a un tubo que

contiene 10.0 mL de Caldo Tripticasa Soya. Incubar por 24 horas a 37.0°C.

Comparar cada tubo con un patrón de turbidez McFarland con una concentración de 1×10^6 bacterias por mililitro.

2.3.2 Realización del Método Kirby Bauer modificado.

Introducir un hisopo estéril en los tubos con caldo de los diferentes microorganismos y eliminar el exceso de líquido, presionando el hisopo contra la pared del tubo, mediante un movimiento rotatorio por encima del nivel del caldo.

Estriar en tres direcciones diferentes, toda la superficie del agar Müeller Hinton con el hisopo. Dejar secar el inóculo por diez minutos a temperatura ambiente.

Por cada placa colocar dos cilindros de acero inoxidable estériles sobre la superficie del agar Müeller Hinton inoculadas utilizando pinzas estériles (ver esquema en anexo No. 4).

Por aparte, preparar diluciones del desinfectante en estudio que rotulen concentraciones de 0.25; 0.50; 1.00; 5.00; 10.0 y 20.0 mg/mL de aceite esencial de orégano. Con pipetas Pasteur rotuladas para cada dilución, colocar las diferentes

concentraciones del desinfectante, en uno de los cilindros de acero inoxidable estériles de cada placa de agar Mueller Hinton inoculado y verter en el cilindro restante, una solución de 20.0 mg/mL de Yodo. Tapar las placas e inocular a 37° C por 24 horas.

2.3.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Retirar los cilindros de acero inoxidable por medio de pinzas estériles, tapar las placas e invertir.

Medir el halo de inhibición de cada placa con un calibrador Vernier; reportar cada diámetro medido en milímetros.

La Concentración Inhibitoria Mínima será la menor dilución del desinfectante en estudio cuyo halo de inhibición promedio producido, sea mayor al diámetro del halo de inhibición de la solución de 20.0 mg/mL de Yodo utilizada como patrón de referencia.

2.4 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DESINFECTANTE A BASE DE OREGANO EN LA SANITIZACION DEL EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA.

2.4.1 Limpieza y sanitización del Equipo de Terapia Respiratoria.

Posterior al lavado con agua y detergente de las partes del equipo de terapia respiratoria, sumergir en un contenedor con el desinfectante en estudio a la Concentración Inhibitoria Mínima determinada y por un lapso de quince minutos, las mascarillas, cámaras humidificadoras y tubos conectores. Por aparte, sumergir por igual período de tiempo, las válvulas de exhalación. Lavar con agua destilada estéril para remover la solución desinfectante y dejar secar.

2.4.2 Diagnostico microbiológico del Equipo de Terapia Respiratoria

2.4.2.1 Obtención de las muestras.

A cada uno de los tres equipos de terapia respiratoria seleccionados, realizar los siguientes muestreos:

Muestreo de mascarillas ambulatorias.

Con un hisopo estéril humedecido con caldo Tripticasa Soya, frotar las superficies internas de las mascarillas ambulatorias. Depositar el hisopo en tubos de ensayo conteniendo el mismo medio de cultivo y transportar al laboratorio para su posterior análisis.

Muestreo de las cámaras humidificadoras y válvulas de exhalación.

Por separado, sumergir dichas partes en caldo Tripticasa Soya estéril por treinta minutos. Extraer las partes con pinzas estériles, tapar los frascos y transportar al laboratorio, para su posterior análisis.

Muestreo de tubos conectores.

Verter 50.0 mL de caldo Tripticasa Soya por cada tubo conector. Recolectar el caldo vertido en un frasco estéril de boca ancha y transportar los frascos al laboratorio para la realización de análisis posteriores.

2.4.2.2 Análisis de las muestras.

Previo a la incubación de los frascos que contienen las muestras, realizar los siguientes análisis:

i. Conteo de Bacterias Heterótrofas.

Por cada caldo Tripticasa Soya utilizado para el muestreo, colocar por duplicado un mililitro del caldo en placas de petri estériles y verter de 12 a 15 mL de Agar Plate Count estéril fundido y conservado a temperatura de 45° C. Mezclar con rotación en una superficie lisa y bien nivelada hasta solidificación del medio. Incubar las placas en posición invertida a 35° C por 48 horas. Contar las colonias que se desarrollen en las placas, hacer el cálculo de colonias por mililitro, multiplicando el dato obtenido por el volumen de caldo Tripticasa Soya utilizado en el muestreo.

Reportar el resultado como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

ii. Conteo de hongos, mohos y levaduras.

Por cada caldo Tripticasa Soya utilizado para el muestreo, colocar por duplicado un mililitro de caldo Tripticasa Soya en placas de petri estériles y verter de 12 a 15 mL de agar Papa Dextrosa estéril acidificado con ácido Tartárico. Mezclar con rotación en superficie lisa y bien nivelada hasta solidificación del medio.

Incubar las placas de petri en posición normal, por cinco días a temperatura de 25° C. Contar las colonias que se desarrollen en las placas; hacer el cálculo de colonias por mililitro, multiplicando el dato obtenido por el volumen de caldo Tripticasa Soya utilizado en el muestreo.

Reportar el resultado como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

2.4.2.3 Identificación de bacterias resistentes al proceso de sanitización utilizando desinfectante formulado a base de orégano.

Una vez realizados los análisis anteriores, incubar todos los frascos que contienen las muestras, a una temperatura de 37° C por 24 horas y en los casos donde el caldo Tripticasa Soya incubado presente turbidez, inocular con una asa bacteriológica por el método de estrías, placas conteniendo agar McConkey y agar Sangre estériles e incubar a 37° C por 24 horas.

Hacer un frotis por cada una de los diferentes tipos de colonias observadas en las placas anteriores y observar al microscopio su comportamiento a la tinción al Gram.

De los resultados observados en la coloración al Gram, realizar pruebas bioquímicas (IMViC) para bacterias Gramnegativas y pruebas de coagulasa, catalasa y manitol para bacterias Grampositivas.

Reportar aquellas bacterias que resulten resistentes a la desinfección con el producto en estudio.

2.5 CONTROL DE CALIDAD DEL DESINFECTANTE FORMULADO A BASE DE OREGANO (Lippia graveolens).

Según la formula desarrollada por la investigadora Rina Toledo, la composición química del desinfectante a base de Orégano (Lippia graveolens) contiene:¹⁵

Aceite esencial	2.00 %
Tensoactivos	7.00 %
Vehículo acuoso c.s.p.	100.00 %

Realizar los siguientes análisis:

2.5.1 Características Físicas.

i. Color.

Observación visual directa del producto.

Especificación.

Debe ser uniforme y estar homogéneamente distribuido en todo el producto.

ii. Olor.

Percepción directa del producto.

Especificación.

Debe presentar un olor característico no desagradable.

iii. Transparencia.

Observación directa a trasluz del producto.

Especificación.

No deberá presentar partículas extrañas en suspensión o cualquier otro tipo de sedimento a la luz y reflejar limpidez.

iv. Medición de pH.

Estandarizar el pHmetro con soluciones tampón, entre el rango de pH 4 - 7 y pH 7 - 10. Llevar la solución desinfectante a una temperatura de 25°C. Introducir el electrodo a la solución y esperar dos minutos. Leer el resultado.

Especificación.

El pH de la solución oscilará entre los valores: no menor a cinco y no mayor de siete.

2.5.2 Características químicas.

Identificación del aceite esencial del orégano por cromatografía de capa fina.^{14,17.}

Fase estacionaria.

Utilizar placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 prefabricadas (Merck).

Fase móvil.

Utilizar una mezcla de Tolueno - Acetato de etilo 93:7.

Preparación de la muestra y del estándar.

Tanto para la muestra como para el estándar, por separado preparar una dilución 1:10 del aceite esencial de orégano en tolueno. Inyectar cinco microlitros de cada solución en dos placas de sílica gel 60 F254 previamente identificadas, colocándolas adentro de una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil.

Detección con tratamiento químico.

Reactivo en spray.

Utilizar vainillina en ácido Sulfúrico.

Solución I. Ácido Sulfúrico al 5% en Etanol.

Solución II. Vainillina al 1% en Etanol.

Rociar las placas cromatográficas vigorosamente con diez mililitros de solución I e inmediatamente después rociar con diez mililitros de la solución II. Secar a 110° C por cinco minutos y comparar los Rf obtenidos por la coloración de las manchas con la placa del estándar de aceite esencial de orégano tratado en forma simultánea.

CAPÍTULO III

CUADROS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cuadro No. 1: DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE LOS EQUIPOS DE TERAPIA RESPIRATORIA SOMETIDOS A LA ACCION SANITIZANTE DEL GLUTARALDEHIDO AL 2.00% Y CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.

EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA	AGENTE SANITIZANTE	ANÁLISIS REALIZADOS			
		CALDO TRIPTICASA SOYA 37 ° C POR 24 h.	AGAR McCONKEY 37 ° C		AGAR SANGRE 37 ° C por 24 h.
			24 h.	48 h.	
MÁSCARA AMBULATORIA	CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.	+	-	-	Colonias grises puntiformes convexas con borde entero y α - hemólisis.
CAMARA HUMIDIFICADORA	CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.	+	-	-	Colonias grises circulares, umbunadas con borde entero y β - hemólisis.
VALVULA DE EXHALACIÓN	GLUTARALDEHIDO AL 2.00%	+	-	-	Colonias blancas puntiformes, convexas con borde entero y β - hemólisis
		+	-	-	Colonias grises circulares, umbunadas con borde entero y β - hemólisis
TUBOS CONECTORES CORRUGADOS	CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.	+	-	-	Colonias blancas puntiformes, convexas con borde entero y β - hemólisis

(+): Hubo crecimiento. (-): No hubo crecimiento.

Cuadro No. 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE LOS EQUIPOS DE TERAPIA RESPIRATORIA SOMETIDOS A LA ACCION SANITIZANTE DEL GLUTARALDEHIDO AL 2.00% Y CLORHEXIDINA 1.50%+CETRIMIDE 15.0%.

EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA	ANÁLISIS REALIZADOS				MICROORGANISMO IDENTIFICADO
	TINCIÓN AL GRAM.	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE COAGULASA	FERMENTACIÓN DE MANITOL	
MASCARA AMBULATORIA	Cocos Gram positivos dispuestos en racimos.	+	-	-	<u>Staphylococcus sp 1</u> Coagulasa negativo.
CAMARA HUMIDIFICADORA	Bacilos largos aislados Gram positivos.	N/A	N/A	N/A	<u>Bacillus subtillis</u>
VÁLVULA DE EXHALACIÓN	Cocos Gram positivos dispuestos en racimos.	+	-	-	<u>Staphylococcus sp 2</u> Coagulasa negativo.
	Bacilos largos aislados Gram positivos.	N/A	N/A	N/A	<u>Bacillus subtillis</u>
TUBOS CONECTORES CORRUGADOS	Cocos Gram positivos dispuestos en racimos.	+	-	-	<u>Staphylococcus sp 3</u> Coagulasa negativo.

(+): Prueba positiva. (-): Prueba negativa. (N/A): No aplica la prueba.

Cuadro No. 3: DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM) DEL DESINFECTANTE A BASE DE OREGANO (Lippia graveolens), POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO.

CONCENTRACIÓN DEL DESINFECTANTE (mg/mL).	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN PRODUCIDO (mm).				
	<u>Staphylococcus</u> <u>sp 1.</u>	<u>Bacillus</u> <u>subtillis</u>	<u>Staphylococcus</u> <u>sp. 2</u>	<u>Staphylococcus</u> <u>sp. 3</u>	DIÁMETRO PROMEDIO
Sln. Patrón 20.00 mg/mL de Yodo	34.0	32.0	33.0	35.0	33.50
0.25	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
0.50	8.00	8.00	11.0	10.0	9.25
1.00	8.00	8.00	13.0	30.0	14.75
5.00	30.0	30.0	20.0	30.0	27.50
10.00	45.0	45.0	25.0	35.0	37.50
20.00	50.0	90.0	35.0	40.0	53.75

CIM: Menor concentración del desinfectante en estudio cuyo halo de inhibición promedio producido sea mayor al halo de inhibición de la solución patrón de 20.0 mg/mL de Yodo.

Cuadro No. 4: EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL DESINFECTANTE A BASE DE OREGANO (Lippia graveolens) EN LA SANITIZACION DE LOS EQUIPOS DE TERAPIA RESPIRATORIA.

EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA	ANALISIS REALIZADOS				MICROORGANISMO IDENTIFICADO
	CONTEO DE BACTERIAS HETERÓTROFAS	CONTEO DE HONGOS, MOHOS Y LEVADURAS	CALDO TRIPTICASA SOYA 37°C.		
			24 h.	48 h.	
MASCARA AMBULATORIA	0 UFC	0 UFC	-	-	-
CAMARA HUMIDIFICADORA	0 UFC	0 UFC	-	-	-
VÁLVULA DE EXHALACIÓN	0 UFC	0 UFC	-	-	-
TUBOS CONECTORES CORRUGADOS	0 UFC	0 UFC	-	-	-

(+): Hubo crecimiento. (-): No hubo crecimiento. (UFC): Unidades Formadoras de Colonias

**Cuadro No. 5: ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL DESINFECTANTE A
BASE DE OREGANO (*Lippia graveolens*).¹⁵**

NOMBRE DEL PRODUCTO:	EN PROCESO DE PATENTE.
SINÓNIMO:	NO TIENE.
CLASIFICACION TERAPEUTICA:	DESINFECTANTE.
CLASIFICACION FARMACOLÓGICA:	BACTERICIDA, FUNGUICIDA.
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	
DESCRIPCIÓN:	Líquido.
COLOR:	Verde translúcido.
OLOR:	Característico.
pH:	5.80 - 6.50.
FORMA FARMACEUTICA:	Emulsión aceite en agua.
DENSIDAD	No determinada.
PUNTO DE EBULLICIÓN	No determinado.
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	
PRINCIPIO ACTIVO:	Compuestos fenólicos y triterpenos no cuantificables.
COMPONENTES :	Surfactantes, humectantes, clarificantes, colorantes.
INFLAMABILIDAD:	No aplica.
INDICACIONES:	Producto concentrado con amplia capacidad microbiocida, destinado para la sanitización de superficies, material y equipo en hospitales y laboratorios.
PRECAUCIONES:	Manténgase bien cerrado y almacenar en lugar fresco. No ingerir.
FECHA DE FABRICACIÓN:	Enero de 2001.
FECHA DE VENCIMIENTO:	Enero de 2003.
PROFESIONAL RESPONSABLE:	Licda. Rina Toledo.

**Cuadro No. 6: CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL DESINFECTANTE A
BASE DE ORÉGANO (*Lippia graveolens*)**

Nombre de Producto: Desinfectante de uso hospitalario		
Forma Farmacéutica: Emulsión.	Uso: Sanitización de material y equipo hospitalario.	
Descripción: Líquido transparente de color verde con Olor característico.		
Lote: 001.	Fecha de Fabricación: Enero 2001.	
Fecha de Vencimiento: Enero 2004. Bibliografía: USP XXIV.		
C A R A C T E R I S T I C A S F I S I C A S		
PRUEBA	ESPECIFICACIONES	RESULTADO
OLOR	CARACTERISTICAS	CONFORME
COLOR	UNIFORME	CONFORME
TRANSPARENCIA	TRANSLUCIDA	CONFORME
pH	5.80 - 6.50	CONFORME
C A R A C T E R I S T I C A S Q U I M I C A S		
Identificación del Aceite Esencial de orégano	Rf ₁ = 0.25, Terpeneol Rf ₂ = 0.36, Linalool. Rf ₃ = 0.87, Timol	CONFORME
_____	_____	
Jefe Control de Calidad	Laboratorista	
Fecha de Reporte: febrero 25 de 2002. Reporte No. CP-001.		

ANALISIS DE RESULTADOS

El **cuadro No. 1**, indica que todas las muestras obtenidas del diagnóstico microbiológico realizado a las diferentes partes del equipo de terapia respiratoria, presentan crecimiento de microorganismos en caldo Tripticasa Soya a 24 horas de incubación, a pesar de ser sometidas a la acción sanitizante del Glutaraldehido al 2.00% para el caso de las válvulas de exhalación, y Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0% para las máscaras ambulatorias, cámaras humidificadoras y tubos conectores corrugados. Al inocular placas de agar Sangre y McConkey con los caldos Tripticasa Soya que presentan crecimiento microbiológico, las placas de agar Sangre, al cabo de 24 horas de incubación, desarrollan cuatro tipos diferentes de colonias con características morfológicas distintas; no así, en agar McConkey donde 48 horas después de ser incubadas, no hubo crecimiento de microorganismos.

Las colonias desarrolladas en las placas con Agar Sangre e inhibidas en agar McConkey, al ser sometidas a la tinción de Gram, confirman la presencia de bacterias Gram positivas, según el **cuadro No. 2**; además de revelar las características microscópicas de las células bacterianas, las cuales se agrupan en dos formas morfológicas: Cocos dispuestos en

racimos y Bacilos largos aislados, ambos Gram positivos. Los bacilos largos aislados corresponden al Bacillus subtilis; presente tanto en las cámaras humidificadoras como en las válvulas de exhalación. Los cocos sometidos a la prueba de Catalasa, muestran la producción de burbujeo, lo cual deduce la presencia de cepas bacterianas pertenecientes al genero Staphylococcus sp., aislados de las máscaras ambulatorias, válvulas de exhalación y tubos conectores corrugados muestreados; sin embargo, no fue posible la identificación de cada una de las especies a las que corresponden, dadas las limitantes de la investigación.

Según el **cuadro No. 3**, una vez aisladas e identificadas los diferentes tipos de cepas bacterianas presentes en los equipos de terapia respiratoria sanitizados con Glutaraldehído al 2.00% ó Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, se procedió a determinar la Concentración Inhibitoria Mínima(CIM) del desinfectante formulado a base de orégano utilizando el método de Kirby Bauer modificado. Para ello, se probaron diferentes diluciones del desinfectante y en la realización del ensayo se llevó como patrón de referencia una solución de 20.0 mg/mL de Yodo, la cual mostró un halo de inhibición con diámetro promedio de 33.50 mm. El desinfectante formulado a base de orégano mostró un diámetro de inhibición directamente

proporcional a la concentración utilizada, en donde a concentraciones mayores de 5.00 mg/mL, los diámetros de los halos de inhibición producidos por el desinfectante, son considerables. De esta forma, tomando como referencia el diámetro de inhibición producido por la solución patrón, el halo de inhibición promedio del desinfectante formulado a base de orégano es de 37.50 mm a una concentración de 10.0 mg/mL; constituyéndose ésta como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Al utilizar el desinfectante a base de orégano a la CIM determinada, en la sanitización de los equipos de terapia respiratoria se determinó:

1. El tiempo de inmersión entre las partes del equipo en el desinfectante fue de 15 minutos.
2. El desinfectante fue removido con facilidad utilizando agua potable y enjuagando con agua destilada estéril.
3. Las partes del equipo se secaron al ambiente y no presentaban deterioro físico, ni olores desagradables o irritantes al olfato.

Al realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante formulado a base de orégano en la sanitización de los equipos de terapia respiratoria, los análisis microbiológicos efectuados demuestran la inhibición en el crecimiento de bacterias heterótrofas, hongos, mohos y levaduras; además no se desarrolla tipo alguno de microorganismo en caldo Tripticasa Soya inclusive después de un periodo de incubación de 48 horas, tal como lo indica el **cuadro No.4**.

Los **cuadros No. 5 y No. 6** indican respectivamente, las especificaciones técnicas del producto manufacturado por la profesional responsable y el certificado de control de calidad realizado al desinfectante de orégano, previo a la realización de los análisis antes descritos; lo cual certifica que el producto en estudio cumple con las especificaciones físicas y químicas detallada por el fabricante; asegurando la presencia de aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) en donde la cromatografía en capa fina realizada determina la presencia de compuestos fenólicos tales como Timol, Linalool y Terpeneol, entre otros, responsables de la actividad antimicrobiana de amplio espectro expuesta por el producto.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos en la parte experimental se concluye que:

En las partes de los equipos de terapia respiratoria analizadas, se encuentran cepas bacterianas Gram positivas pertenecientes a los géneros de Bacillus subtillis y Staphylococcus sp coagulasa negativos, a pesar de ser expuestos a la acción sanitizante del Glutaraldehido al 2.00% para el caso de las válvulas de exhalación, y Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, en las máscaras ambulatorias, cámaras humidificadoras y tubos conectores corrugados. Entre las posibles razones por las cuales dichas bacterias se aislaron de los equipos sanitizados tenemos:

1. El alto contenido de peptidoglucano y bajo contenido lipídico de la pared celular de estos microorganismos, les permite resistir a la acción germicida de varios agentes químicos por la capacidad de encapsularse y formar esporas para el caso del Bacillus subtillis.
2. El tiempo de contacto entre el Glutaraldehido al 2.00% con las partes del equipo de terapia respiratoria, es menor al detallado por el fabricante, quien recomienda un

tiempo de inmersión completa de las partes a sanitizar por un lapso de 10 horas, para destruir esporas patógenas resistentes como Bacillus subtilis.

3. La calidad del producto suministrado no es óptima, lo cual le resta efectividad y eficacia.

4. La inexistencia de un área exclusiva en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales donde se lleve un control microbiológico del ambiente que permita realizar y asegurar la limpieza, sanitización, secado y almacenamiento de las partes de los equipos de terapia respiratoria, permite que la contaminación del ambiente vuelva ineficiente el proceso de sanitización al cual es sometido el equipo.

La utilización de los equipos de terapia respiratoria contaminados con cepas bacterianas pertenecientes a los géneros: Bacillus subtilis y Staphylococcus sp coagulasa negativos, son un vehículo idóneo para la transmisión de enfermedades en pacientes tales como: infecciones en las vías respiratorias, problemas dermatológicos, meningitis, endocarditis y conjuntivitis; generando costos al hospital en cuanto requiere el uso de medicamentos; aumenta el tiempo de

estadía de los pacientes y sus cuidados; hay menor disponibilidad de camas para nuevos pacientes, además de existir una alta probabilidad de infección de otros pacientes incluyendo al personal del hospital, entre otros factores.

Utilizando el método de Kirby Bauer modificado, el desinfectante a base de orégano (Lippia graveolens), presenta un halo de inhibición mayor al de la solución patrón de Yodo, a una concentración de 10.0 mg/mL; siendo eficaz en la inhibición del crecimiento de Bacillus subtilis y Staphylococcus sp coagulasa negativos, contaminantes principales de los equipos de terapia respiratoria.

El desinfectante a base de orégano (Lippia graveolens) presenta buenas características de enjuagabilidad, efecto residual no tóxico a la concentración del producto; no es desagradable al olfato; no deteriora el material del cual está hecho el equipo; además no daña las manos del personal, así como también reduce el costo de utilización de agua destilada estéril, ya que dichos factores no influyen en la inhibición del crecimiento de bacterias, hongos, mohos y levaduras a una Concentración Inhibitoria Mínima de 10 mg/mL por un tiempo de inmersión de quince minutos de las partes del equipo de terapia respiratoria.

El desinfectante analizado manifiesta características físicas conformes a las especificaciones técnicas del fabricante; además de presentar aceite esencial de orégano (Lippia graveolens), en su composición química, el cual se caracteriza por presentar terpenoides derivados de la fenilpropanona y compuestos fenólicos, tales como: Timol, Linalool, Terpeneol, entre otros, responsables de la actividad antimicrobiana de amplio espectro del producto. Sin embargo, no fue posible clasificar al desinfectante en estudio dado que no se cuenta con el equipo tecnológico necesario para realizar una investigación exhaustiva orientada a determinar su mecanismo de acción.

CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Es necesario aumentar el tiempo de inmersión de las partes del equipo de terapia respiratoria en la solución de Glutaraldehido al 2.00%, por un tiempo de 10 horas, para que cumpla su función esporicida.

Se recomienda la implementación del desinfectante a base de orégano (*Lippia graveolens*), para la sanitización del equipo de terapia respiratoria en sustitución del Glutaraldehido al 2.00% y Clorhexidina 1.50%+Cetrimide 15.0%, dada su alta efectividad y eficacia al reducir el tiempo de inmersión para la sanitización de las partes del equipo de terapia respiratoria a 15 minutos. Además, la amplia capacidad microbiocida del desinfectante a base de orégano, inclusive contra microorganismos esporulados, le permite ser utilizado con toda seguridad para la sanitización de pisos y paredes del hospital, disminuyendo así la contaminación cruzada del ambiente institucional.

Es necesaria la asignación de un área exclusiva para la realización de la limpieza y sanitización de las partes de los equipos de terapia respiratoria en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), que contribuya en asegurar la

eficacia de los procesos orientados a contribuir en la prevención de las infecciones nosocomiales.

El Comité de Infecciones Nosocomiales deberá establecer una política que permita monitorear periódicamente la efectividad de los agentes antimicrobianos utilizados en la sanitización de los diferentes equipos de uso hospitalario; para lo cual habrá que tomar muestras por lavado de los equipos y probar la eficacia de los agentes desinfectantes a distintas diluciones; estableciendo además las rotaciones periódicas de los mismos, con la finalidad de disminuir la probabilidad de que los microorganismos adquieran resistencia.

Es necesario que un profesional Químico Farmacéutico sea el encargado del monitoreo microbiológico periódico de los equipos de uso hospitalario sometidos a procesos de desinfección y esté a su cargo la selección y preparación de las diluciones de los diferentes agentes desinfectantes utilizados en el hospital, así como la respectiva capacitación al personal que utilizará dichos productos, para la obtención de mejores resultados en la prevención de las infecciones nosocomiales.

Se hace necesaria la realización de una investigación enfocada a determinar en forma exhaustiva el mecanismo de acción del desinfectante a base de orégano (Lippia graveolens), con el objetivo de identificar y documentar las ventajas que presenta respecto a los demás agentes antimicrobianos existentes en el mercado.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA.

1. BLACK, Seymours S., "Desinfection, Sterilization and Preservation". Third Edition. Philadelphia. Lea & Febiger. 1983.
2. BERRIOS VIDES, Salvador Ernesto. "Determinación por método de Mitscher de la actividad antimicrobiana de quince aceites esenciales extraídos de la Flora Salvadoreña". El Salvador. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 2001.
3. CABEZAS DE ALLWOOD, ADELA. "Manual de Farmacología Clínica", Primera edición. El Salvador. Editorial EPACTA, 1984.
4. CACERES, A. "Plantas de Uso Medicinal en Guatemala". Primera edición. Guatemala: Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos, 1966.
5. CONTRERAS TORRES, Leonora Arely. "Evaluación microbiológica de desinfectantes elaborados en El Salvador y comercializados en el área metropolitana, por los métodos Coeficiente Fenólico y Kirby Bauer

- modificado". El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 1996.
6. ESCOBAR SALAZAR, Patricia del R., RODRIGUEZ DIAZ, Cecilia M., "Formulación y desarrollo de un desinfectante para pisos y su control de calidad". El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 1996.
 7. Farmacopea Vegetal Caribeña. Primera edición, Ediciones Emite Desormeaux, Santo Domingo, 1997.
 8. HERRERA SALAZAR, Ena E.; ZULETA CHAVEZ, Rosa C.; "Determinación de la Bioactividad de los aceites esenciales de quince especies vegetales, mediante el bioensayo Artemia salina". El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 2001.
 9. JAWETZ, E., MELNIK, J.L., ADELBERG, E.A.. "Microbiología Médica". 14^a. Edición. México D.F.: editorial Manual Moderno, 1992.
 10. KATZUNG, B.G. "Basic & Clinical Pharmacology", 2nd Edition, California: Lange Medical Publications, 1984.

11. KONEMAN, Elmer W.; ALLIM, Stephen D.; DONSEL, V. R.; JANDA, William; SOMMERS, Herbert M.; WIM, Washington C. "Diagnóstico Microbiológico". Tercera edición. México D. F.: editorial Médica Panamericana, 1997.
12. Norma centroamericana del ICAITI 4011: "Procedimientos de Muestreo por atributos y tablas para inspección por atributos. Planes de muestra simple, doble y múltiple con rechazo", Guatemala, 1986.
13. Recopilación monografía de *Lippia graveolens*, seminario Iberoamericano del Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. (CYTED), 1988.
14. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. "Cromatografía en papel y capa delgada". OEA, Washington D. C. 1975.
15. TOLEDO MENDOZA, Rina A. "Formulación de un desinfectante a partir del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) para la sanitización de superficies, material y equipo de uso hospitalario y de laboratorio". El Salvador, Sección de Investigación Aplicada y Tesis

Profesionales, Facultad de Química y Farmacia,
Universidad de El Salvador, 2001.

16. TORRES NAVAS, Blanca; FIGUEROA, Coralia; ALFARO, Dolores M. "Evaluación microbiológica de la potencia de antisépticos y desinfectantes usados en cateterización urinaria en el Hospital Rosales de San Salvador". El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 1986.
17. WAGNER H.; BLADT S.; ZGAINSKI E. M. "Plant Drug Analysis" a thin layer chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, Tokio, 1984.
18. www.crosswinds.net/~oregini
19. www.healthnotes.com

ANEXOS

ANEXO No. 1
FOTOGRAFIA DEL ORÉGANO (Lippia graveolens) HBK

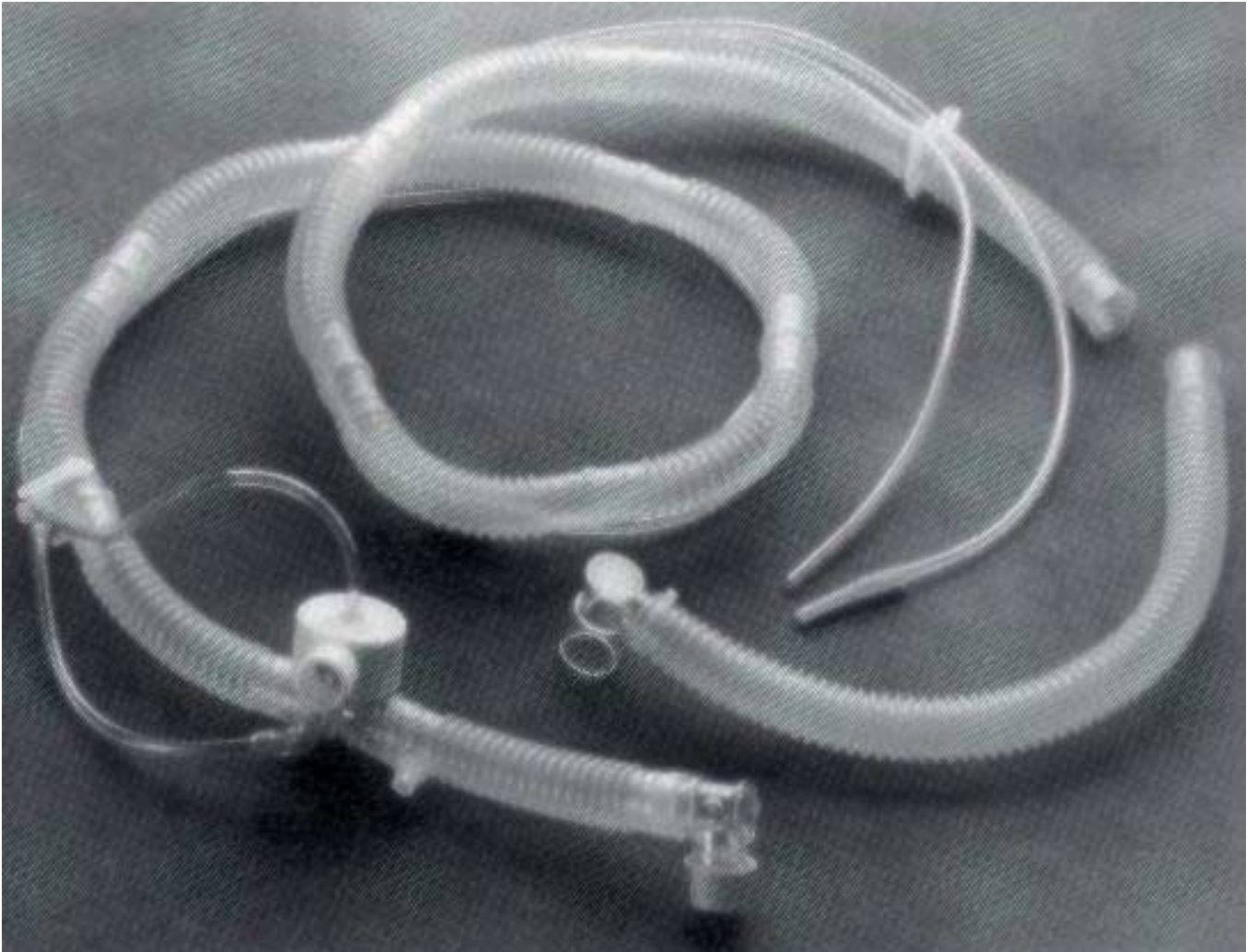


ANEXO No. 2
EQUIPO DE TERAPIA RESPIRATORIA

MÁSCARAS AMBULATORIAS

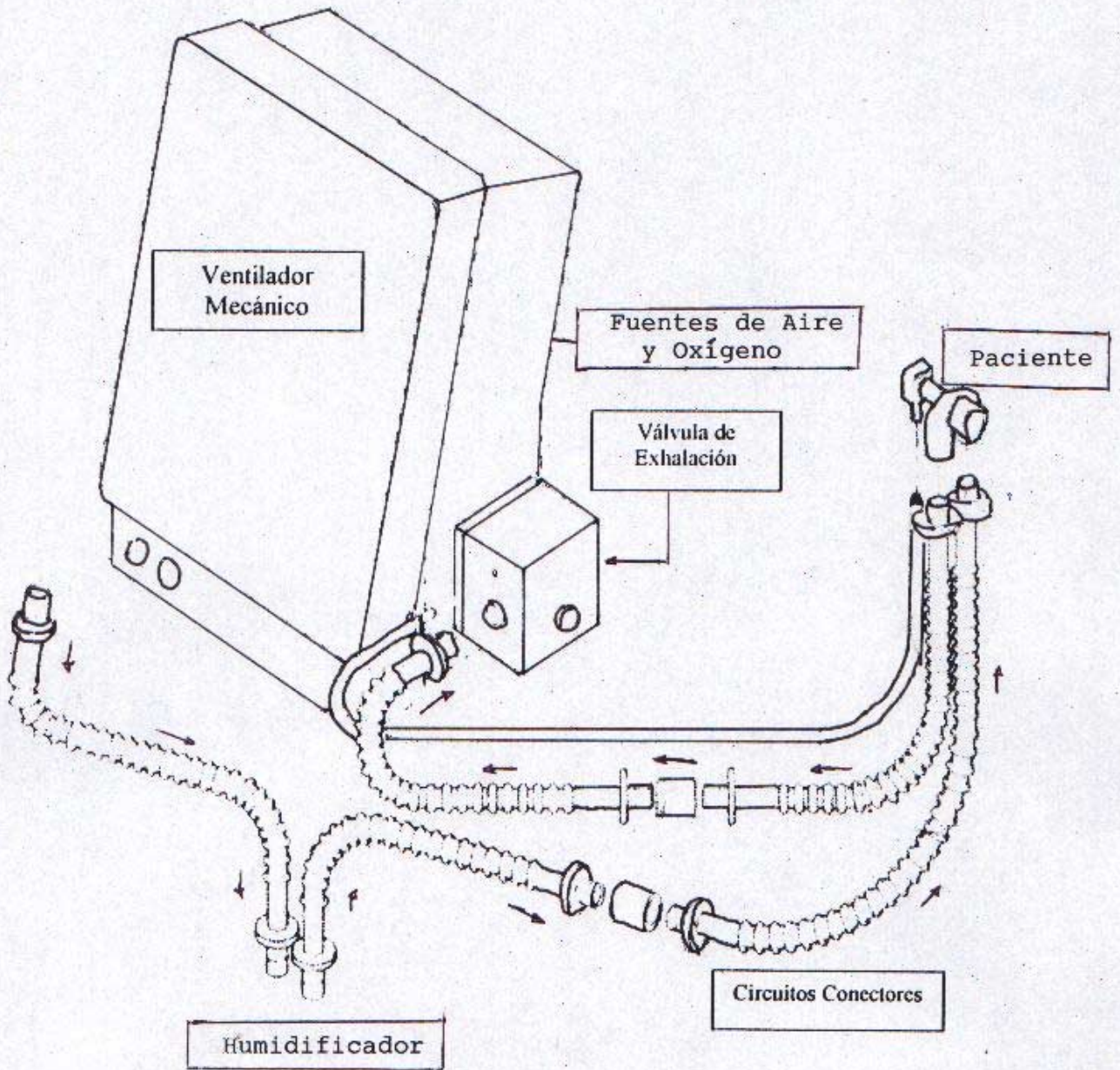


TUBOS CONECTORES



CÁMARAS HUMIDIFICADORAS





ANEXO No. 3

Tabla II-A: Planes de Muestreo simple para inspección normal¹²

Letra clave de muestra	Tamaño de muestra	Niveles de Calidad Aceptable (Inspección Normal)																					
		0.010	0.015	0.025	0.40	0.65	1.0	1.5	2.5	4.0	6.5	10	15	25	40	65	100	150	250	400	600	1000	
		Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re
A	12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
B	3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
C	5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
D	8	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
E	12	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
F	20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
G	32	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
H	50	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
I	80	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
K	125	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
L	200	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
M	315	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
N	500	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
P	800	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Q	1250	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
R	2000	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1

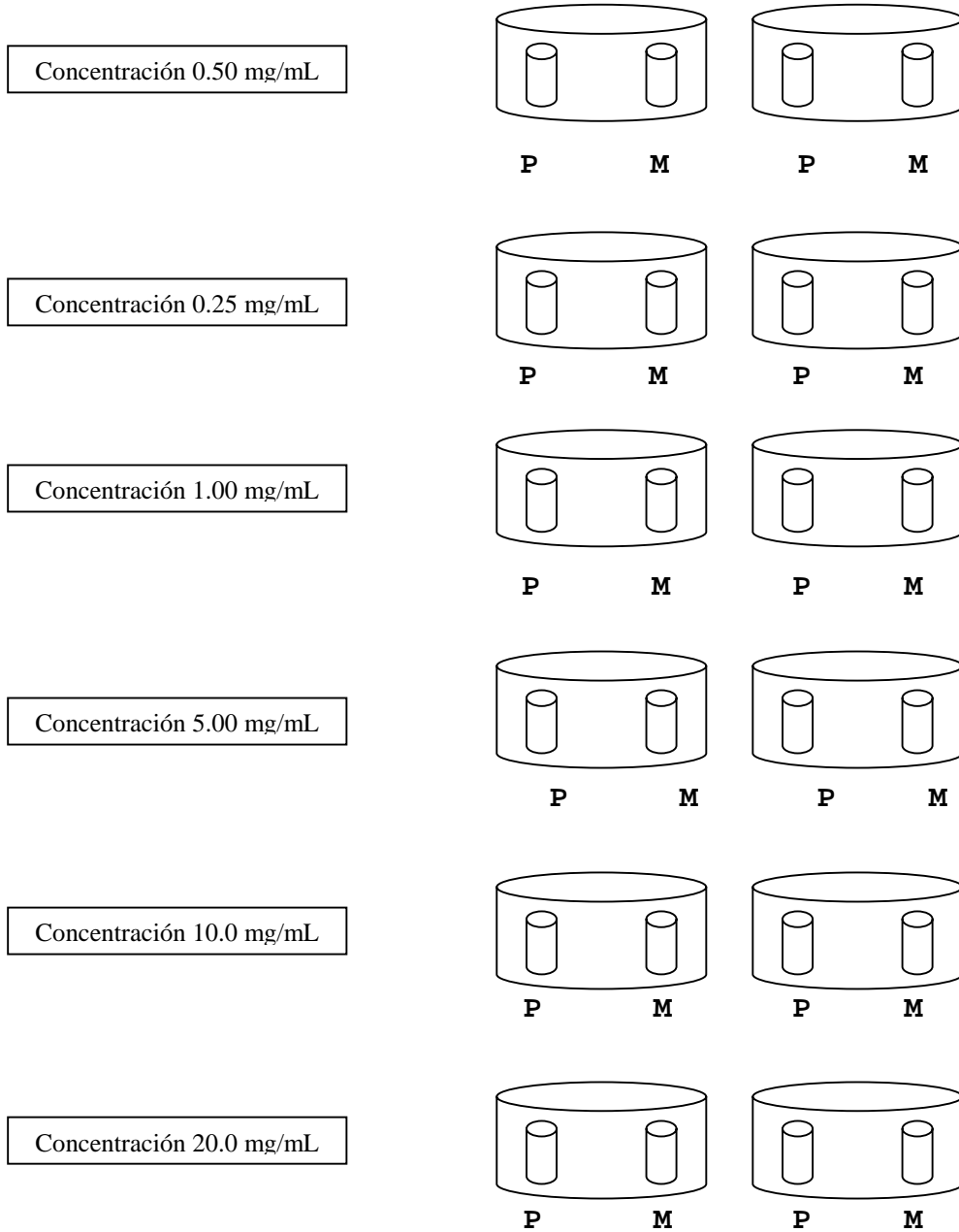
↘ = Debe usarse el primer plan de muestreo bajo la flecha. Si el tamaño de la muestra es igual o mayor que el tamaño del lote o de la partida, se debe hacer inspección 100%.

↙ = Debe usarse el primer plan de muestreo sobre la flecha.

Ac = Número de aceptación.

Re = Número de rechazo.

ANEXO No. 4
ESQUEMA DEL METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO

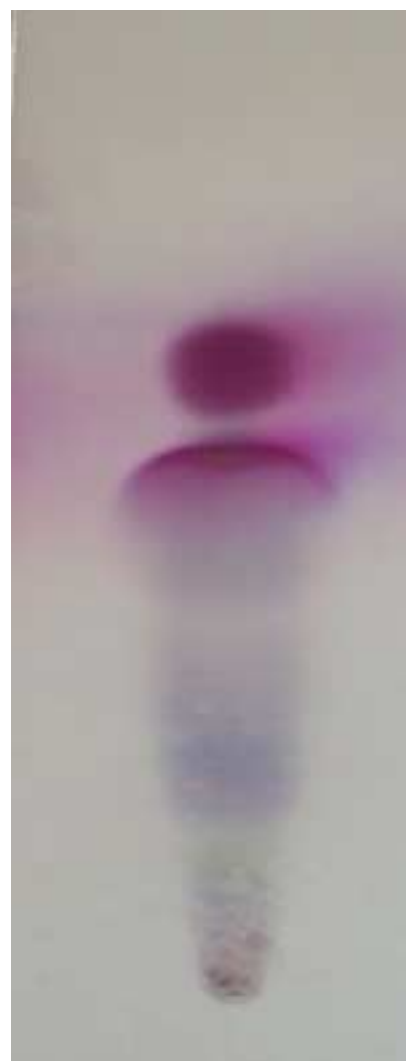


P: SOLUCIÓN PATRON DE 20.0 mg/mL DE YODO.
M: DESINFECTANTE EN ESTUDIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

ANEXO No. 5
IDENTIFICACION DEL ACEITE DE OREGANO
(Lippia graveolens) HBK POR CROMATOGRAFÍA
EN CAPA FINA.



ESTANDAR



MUESTRA EN ESTUDIO