



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



Efecto bactericida de superficies de cobre y acero inoxidable sobre *Escherichia Coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus Aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas Aeruginosa* multirresistente aisladas de procesos infecciosos.

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Licenciado En Biología Microbiología -
Parasitología**

PRESENTADA POR:

Br. Callirgos Chabayan, Chilbernán

Br. Jiménez Raymundo, Luis Enrique

LAMBAYEQUE, PERÚ

2019

Efecto bactericida de superficies de cobre y acero inoxidable sobre *Escherichia Coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus Aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas Aeruginosa* multirresistente aisladas de procesos infecciosos.

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

APROBADA POR:

Lic. Mario Cecilio Moreno Mantilla

PRESIDENTE

Dra. Gianina LLontop Barandiarán

SECRETARIA

Dra. Ana María del Socorro
Vásquez del Castillo

VOCAL

Dra. Martha Vergara Espinoza

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERU

2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a Dios por permitirme terminar mi propósito con bastante esfuerzo y dedicación también por darme la dicha de la vida.

A mi asesora, Dra. Martha Vergara Espinoza, por demostrar su interés y paciencia en mi investigación, además agradecerle por la confianza que me ha brindado durante todo este tiempo.

Al Msc. Roberto Ventura Flores, por proporcionarnos las cepas bacterianas.

Al profesor Msc. Jorge Fupuy Chung, por su apoyo y orientación en mi investigación en la parte estadística.

Chilbernan Callirgos Chabayan.

AGRADECIMIENTOS

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son el resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los pones en frente mío para que mejore como ser humano y crezca de diversas maneras.

Gracias a mis padres César Enrique y Rosa Isabel por el amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban por mi avance y desarrollo de esta tesis, es simplemente único y se refleja en la vida de un hijo.

A mi padre, César Enrique Jiménez Pintado, por desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de tus palabras que me guían cada día.

A mi madre, Rosa Isabel Raymundo Sosa, por sus palabras de aliento y permanente preocupación por mi bienestar fueron cruciales para la finalización de mi tesis, gracias por todo lo que haces por mí.

A mi hermana, Ana Rosa del Pilar con quien comparto muchos momentos de alegría y tropiezos de los cuales salimos triunfadores, por tu confianza y ayudarme a no darme por vencido, eres uno de mis pilares de mi vida.

A mi asesora, Dra. Martha Vergara Espinoza, por aceptar realizar esta tesis bajo su dirección, por la orientación y su capacidad para guiar mis ideas, su apoyo y confianza me permitieron aprender mucho más de lo estudiado en el proyecto.

Luis Enrique Jiménez Raymundo.

DEDICATORIA

A mis padres, Chilbernan y Silvia, por brindarme su amor, apoyo, comprensión y educación durante toda esta larga carrera la Biología.

A mis hermanas, jaky Judith y Dely Mabel, por estar siempre a mi lado y poder darles un ejemplo para su futuro para que sean mejores que yo.

A mis familiares, quienes nunca han dudado de mí y sus deseos de superación tanto profesional como personal.

Chilbernan Callirgos Chabayan.

DEDICATORIA

A Dios y a mis abuelitos, quienes desde el cielo y la tierra guían mi camino.

A mis padres, César Enrique y Rosa Isabel, pilares fundamentales en mi vida, con mucho amor y cariño, les dedico todo mi esfuerzo, en reconocimiento a todo el sacrificio puesto para que yo pueda estudiar, se merecen esto y mucho más.

A Ana Rosa mi querida hermana por ser mi apoyo incondicional.

Los Amo.

Luis Enrique Jiménez Raymundo.

CONTENIDO

Pag.

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes de la investigación.....	5
2.2. Base teórica.....	9
III. MATERIALES Y METODOS.....	13
3.1. Materiales	13
3.1.1.Materiales biológicos.....	13
3.1.2.Material metálico	13
3.1.3.Población y Muestra	13
3.2. Métodos	14
3.2.1.Variables de estudio.....	14
3.2.2.Tipo de estudio y diseño de contratación de hipótesis	14
3.2.3.Recolección de la muestra	14
3.2.4.Determinación del efecto bactericida de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre las cepas bacterianas	14
3.2.4.1.Preparación del material metálico	15

3.2.4.2.Preparación de inóculos bacterianos.....	16
3.2.4.3.Preparación de diluciones bacterianas	16
3.2.4.4.Exposición de los inóculos bacterianos sobre las superficies de cobre y acero inoxidable.	17
3.2.4.5.Retiro y siembra de los inóculos bacterianos procedentes de las superficies de acero inoxidable y cobre.....	17
3.2.5.Determinación del efecto bactericida de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre las cepas bacterianas según tiempo de exposición.....	19
3.2.6.Análisis estadístico de Datos	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	27
VI. CONCLUSIONES.....	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
IX. ANEXOS	40

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 01	17
Tabla 02	22
Tabla 03	24
Tabla 04	25
Tabla 05	25
Tabla 06	26
Tabla 07	46
Tabla 08	47
Tabla 09	48
Tabla 10	49
Tabla 11	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Láminas de acero inoxidable dentro de las placas condicionadas.	15
Figura 2.	A: Suspensión bacteriana diluida en 2-3x 10 ⁸ UFC. B: Comparación de la suspensión bacteriana con el tubo de Mc Farland N° 01.	16
Figura 3.	Procedimiento de exposición de inóculos bacterianos sobre las superficies de cobre y acero inoxidable. A: Extracción de 10 uL del inóculo bacteriano. B: Exposición de los 10 uL de inóculo bacteriano. C: Lavado de las láminas de acero inoxidable y cobre. D: Inoculación de la última dilución de acero inoxidable y cobre. E: Siembra del inóculo bacteriano en Agar Müller Hinton.	18
Figura 4.	Esquema para evaluar el efecto bactericida y tiempo de exposición de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre la cepa bacteriana.	19
Figura 5.	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas en Müller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A.1 minuto, B.5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos.	22
Figura 6.	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino en Müller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A. 1 minuto, B. 5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos.	23
Figura 7.	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente en Müller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A. 1 minuto, B. 5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos	23
Figura 8.	Placas Petri acondicionas con algodón humedecido utilizadas en la experimentación.	40
Figura 9.	Láminas de acero inoxidable y de cobre flameadas con etanol.	40
Figura 10.	Antibiograma para <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido aislada de una ITU.	41
Figura 11.	Antibiograma para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multiresistente aislada de una herida profunda.	41
Figura 12.	Antibiograma para <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente aislada de una herida superficial.	42
Figura 13.	Diferencias del crecimiento bacteriano entre las láminas de cobre en comparación con las láminas de acero inoxidable.	42
Figura 14.	Diferencia del crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido, <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.	43
Figura 15.	Diferencia del crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido, <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.	43
Figura 16.	Diferencia del crecimiento bacteriano en comparación al tiempo.	44
Figura 17.	Crecimiento bacteriano de las 9 cepas, 3 <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido, 3 <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente y 3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente.	44
Figura 18.	Bacterias de <i>Escherichia coli</i> productoras de betalactamasas de espectro extendido viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.	45
Figura 19.	Bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.	45
Figura 20.	Bacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.	46

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto bactericida de las superficies de cobre sobre *Escherichia coli* betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente aisladas de procesos infecciosos. **Método:** investigación experimental, diseño de contrastación de hipótesis de estímulo creciente. Se usaron 3 cepas por cada especie bacteriana aisladas de infecciones hospitalarias, con una exposición de tiempo (1, 5, 10, 20, 30 y 40 min) considerando 3 repeticiones por cada cepa se totalizó 324 unidades experimentales. **Resultados:** el recuento de colonias después de 10 minutos de exposición a superficies de cobre fue de cero en las tres cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. Con *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, se observó una eliminación similar de bacterias iniciales $2-3 \times 10^8$ UFC, en un tiempo aproximado de 10 minutos, por otro lado, la eliminación del *Staphylococcus aureus* meticilino resistente transcurrido los 20 minutos de exposición. **Conclusiones:** Las superficies de cobre tienen efecto bactericida sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, disminuyendo las UFC/mL a 10,15 y 10 minutos.

Palabras claves: efecto bactericida, cobre, acero inoxidable, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Objective: To determine the bactericidal effect of copper surfaces on Betalactamase *Escherichia coli* of extended spectrum, resistant *Staphylococcus aureus* methicillin and *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente isolated from infectious processes. **Method:** Experimental research, design of contrasting hypothesis of increased stimulus. Three strains were used for each bacterial species isolated from hospital infections, with a time exposure (1, 5, 10, 20, 30 and 40 min) considering 3 replicates for each strain 324 experimental units were totaled. **Results:** The colony count after 10 minutes of exposure to copper surfaces was zero in the three strains of *Escherichia coli* producing betalactamase of extended spectrum. With multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, a similar elimination of initial $2\text{-}3 \times 10^8$ CFU bacteria was observed, in a time of approximately 10 minutes, on the other hand, the elimination of the Methicillin heavy duty *Staphylococcus aureus* after 20 minutes of Exhibition. **Conclusions:** Copper surfaces have bactericidal effect on *Escherichia coli* producing betalactamase of extended spectrum, *Staphylococcus aureus* resistant methicillin and multidrug *Pseudomonas aeruginosa*, reducing the CFU/mL to 10.15 and 10 minutes.

Key words: bactericidal effect, copper, stainless steel, *Escherichia coli*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente las infecciones intrahospitalarias son causa de morbimortalidad en pacientes, los principales agentes asociados son *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y *Escherichia coli* productora de BLEE (Palma *et al.*, 2010); las infecciones por SAMR están asociados a hospitalizaciones prolongadas, mortalidad incrementada y costos de tratamiento elevados. Se ha determinado que hasta el 50 % de hemocultivos son positivos de SARM en varios hospitales de Lima (García, 2012) y hasta el 75,6 % en los Hospitales del Ministerio de Salud y ESSALUD. (Arce *et al.*, 2012)

Asimismo, enterobacteriaceas como *E. coli* productoras de BLEE están distribuidas tanto a nivel de la comunidad como en hospitales en donde causan altas tasas de mortalidad (García 2012), en el Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo se ha identificado a esta bacteria en personas de edad avanzada (mayores de 60 años) atendidos en los diferentes servicios del hospital (Montoya *et al.*, 2013), también se describe en el Hospital Nacional Guillermo Almenara en el área hospitalaria que *E. coli* aislada posee una tasa de producción de BLEE del 55% siendo estos patógenos altamente resistentes a los antimicrobianos. (Adrianzén *et al.*, 2013)

Es preocupante el perfil de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes hospitalizados ya que alrededor del 50% de los aislados son multirresistentes y un tercio (35%) son panresistentes, mientras que, en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de hemocultivos de varios hospitales de Lima (García *et al.*, 2012) , se encontró que 59 % de las cepas eran multirresistentes (MDR), motivo por el cual es causa frecuente

de infecciones severas adquiridas en los hospitales como neumonía asociadas al ventilador y bacteriemia (Montalvo *et al.*, 2009)

Por lo mencionado anteriormente, se ha reportado cepas de microorganismos resistentes a una variedad de antibióticos, como es el caso de las bacterias *Escherichia coli* betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, las cuales frecuentemente se asocian a diferentes infecciones clínicas que son vehiculizadas a través de fómites y equipos (mascarilla, respiradores, catéteres, sondas). Lo que sugiere que el material transportable mantiene la viabilidad de los microorganismos patógenos. Cabe señalar que esta resistencia es causante de mayor mortalidad además de la elevación en los costos de la salud.

Las bacterias en mención tienen como característica común su alta frecuencia de aislamientos de infecciones y su resistencia a los diferentes antimicrobianos, a pesar de ello no ha sido evaluada su inhibición en superficies de cobre, aun cuando, a través de los años, científicos han determinado que el cobre en cantidades muy pequeñas, tiene el poder de controlar una gran variedad de hongos, algas y microorganismos peligrosos (Biohealth, 2009). El cobre es antimicrobiano en ambientes acuosos y húmedos, diversas investigaciones comprueban la actividad bactericida que tienen las superficies metálicas de cobre y sus aleaciones, frente a una amplia gama de bacterias patógenas para la salud humana (Echeverría *et al.*, 2010).

En el Perú existe evidencia donde comprobaron en dos hospitales de la Región Lambayeque la actividad bactericida *In vitro* de las superficies de cobre frente a

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones intrahospitalarias (IIH), así se determinó la eliminación total de dichas bacterias en tiempos de 10,15 y 60 minutos (Neciosup *et al.*, 2015). En otro estudio se demostró la misma actividad bactericida del cobre frente a bacterias multirresistentes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* asociados a infecciones intrahospitalarias en donde no se halló UFC después de los 40 minutos de exposición (Ventura *et al.*, 2016).

En relación al acero inoxidable, es importante señalar que en el Perú representa el metal predominante en diferentes objetos que puede tener múltiples aplicaciones particularmente en la fabricación de objetos hospitalarios, sin embargo, no se han encontrado referencias relacionadas con el efecto inhibitorio sobre los patógenos, menos aún efecto bactericida sobre cepas nativas hospitalarias comunes con un patrón de multirresistencia según su especie.

Frente a todo lo expresado, se cuestionó ¿Tienen efecto bactericida las superficies de cobre y acero inoxidable sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aisladas de procesos infecciosos? Considerando que las superficies de cobre y acero inoxidable tienen efecto bactericida sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aisladas de procesos infecciosos., se programó y ejecutó el presente estudio cuyo objetivo es, determinar el efecto bactericida del cobre sobre bacterias patógenas como *Escherichia coli* BLEE,

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SAMR) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Con la presente investigación se amplía el conocimiento de la efectividad del cobre en la inhibición de bacterias causantes de infecciones intrahospitalarias, además representa una propuesta de utilización de cobre en la elaboración de algunos materiales de uso hospitalario como pasa manos, perillas y camas lo que a su vez es beneficioso por la disminución de costos en relación a otros metales utilizados frecuentemente en los ambientes hospitalarios.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Noyce *et al.*, (2006), basado en un modelo indirecto determinaron la efectividad bactericida de superficies de cobre y latón frente a 3 cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, MRSA (NCTC 10442), EMRSA -1 (NCTC 11939) y EMRSA -16 (NCTC 13143) a concentraciones de 10^7 UFC/ml, en comparación con el acero inoxidable, en varios periodos de tiempo, a temperaturas de 4°C y 22°C. Demostraron un efecto antimicrobiano del cobre en MRSA, EMRSA -1 y EMRSA 16 a 22°C donde se produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) después de 45, 60 y 90 minutos respectivamente. Para el latón se logró reducciones en la viabilidad, aunque no en la misma medida que el cobre puro, en particular a partir de 3 horas después para todas las cepas, el promedio de UFC restantes para MRSA, EMRSA-1 y EMRSA-16 eran de 333, 733 y $3,9 \times 10^5$ UFC respectivamente, logrando una eliminación completa después de 4,5 horas de exposición. Mientras que a 4°C se logró una destrucción completa en 6 horas. Mientras que con el acero inoxidable se detectaron bacterias viables a 22°C hasta después de 72 horas con $6,2 \times 10^6$ UFC restantes en comparación con $1,1 \times 10^7$ en el tiempo de inicio.

Methar *et al.*, (2008), realizaron un estudio *in vitro* mucho más amplio siguiendo el modelo de Noyce para comprobar la actividad antimicrobiana del cobre y sus aleaciones en comparación con el acero inoxidable y cloruro de polivinilo (PVC) frente a patógenos nosocomiales y *Mycobacterium tuberculosis*. Comprobaron que el cobre y el latón inhibieron totalmente a *Acinetobacter baumannii* en 180 minutos a temperatura ambiente; se observó para *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae* una reducción de 10^7 UFC/mL además fueron inhibidas totalmente en 60 minutos a temperaturas de 4°C y 25°C; *Pseudomonas aeruginosa* fue inhibida por el latón en 180 minutos y por el cobre

en 270 minutos mostrando una reducción significativa de 10^7 UFC/mL con respecto al inóculo inicial, finalmente se probó en dos cepas diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* fueron eliminadas en 15 días en superficie de cobre encontrándose una reducción de 88% y 98% con respecto a las superficies de cloruro de polivinilo.

En nuestro país, Neciosup *et al.*, (2015) comprobaron el efecto germicida *in vitro* de las superficies de cobre frente a patógenos intrahospitalarios aislados de dos hospitales de Chiclayo, utilizando como control láminas de acero inoxidable. Concluyeron que las cepas de *E. coli* en un numero de 2×10^7 UFC/mL fueron eliminadas entre 10 a 15 minutos, *P. aeruginosa* mostró resultados similares frente a la exposición de superficies de cobre con un inóculo inicial de $2-3 \times 10^8$ UFC/mL en tan solo 10 minutos, todo lo contrario, en *S. aureus* pues presentó una eliminación lenta y gradual con lecturas de 6×10^4 UFC/ml en 20 minutos, $1,1 \times 10^3$ UFC/ml en 45 minutos y una eliminación total a los 60 minutos.

En el Hospital Regional de Lambayeque, Ventura *et al.*, (2016), evaluaron la actividad bactericida de superficies de cobre sobre bacterias multirresistentes asociadas a infecciones intrahospitalarias, siendo las bacterias en estudio *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (MRSA). Encontraron los autores que *A. baumannii* permaneció viable hasta los 10 minutos con un recuento promedio de $0,11 \times 10^5$ UFC/mL, *P. aeruginosa* y *S. aureus* hasta los 20 minutos con conteos promedio de $0,11 \times 10^5$ UFC/mL y $1,22 \times 10^5$ UFC/mL respectivamente. Sin embargo, la eliminación total se presentó a los 40 minutos donde no se halló UFC en las superficies de cobre.

En Chile, utilizando un modelo diferente, determinaron la adherencia de bacterias asociadas a infecciones intrahospitalarias frente a la capacidad bactericida de las superficies de cobre y el acero inoxidable; cepas como *Staphylococcus aureus* resistente

a la meticilina (MRSA) observaron diferencias significativas en la adherencia a láminas de Cu y Ai, esta cepa se adhirió rápidamente en Ai y observaron un aumento progresivo de hasta $1,0 \times 10^7$ UFC/mL en el recuento final a las 48 horas. En cambio, en la superficie de cobre no se detectó adherencia. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* no presentaron adherencia a las láminas de cobre durante 48 horas que duró la evaluación, en cambio se adhirieron de forma eficiente en el acero inoxidable a partir de las 2 horas alcanzando a las 48 horas recuentos de $9,0 \times 10^4$ UFC/mL en *Klebsiella pneumoniae* y en *Acinetobacter baumannii* hasta 1×10^7 UFC/mL. Todo lo contrario, en *Pseudomonas aeruginosa* donde la adherencia fue en ambas superficies a partir de las 2 horas llegando a alcanzar recuentos de 1×10^7 UFC/mL a las 48 horas en ambos tipos de láminas. (Prado *et al.*, 2013)

Empleando metodología estándar y materiales descritos en una normal industrial japonesa, JIS Z 2801, Mitchel *et al.*, (2009), compararon las propiedades antimicrobianas del cobre y la plata influenciadas por la temperatura y humedad relativa (HR) sobre *Staphylococcus aureus* MRSA. Revelaron que los materiales de plata fueron eficaces en la inhibición bacteriana en alta humedad 90% HR y elevada temperatura $\sim 35^\circ\text{C}$, pero no mostraron una respuesta a niveles más bajos de temperatura $\sim 20^\circ\text{C}$ y humedad 20% HR. Sin embargo, el cobre es capaz de actuar en ambas condiciones de la prueba tanto en $\sim 35^\circ\text{C}$ con 90% HR y $\sim 20^\circ\text{C}$ con 20% HR mostrando una reducción de 7log con respecto al inóculo inicial de 2×10^7 UFC/mL de forma eficaz.

Koseaglu *et al.*, (2015) ejecutaron una investigación para evaluar la actividad antimicrobiana de tres metales Cu 99%, latón que contiene 63% de cobre y acero inoxidable, este último como control frente a patógenos nosocomiales resistentes a

múltiples fármacos (MDR). Observaron que el Cu 99% mostró un efecto bactericida casi desde el tiempo cero para *Acinetobacter baumannii*, mientras que para *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Pseudomonas aeruginosa* el efecto se presentó en una y dos horas respectivamente. El latón (Cu 63%) sólo mostró efecto bactericida a las 24 horas en *Pseudomonas aeruginosa*. Las superficies de acero inoxidable después de 6 horas presentaron un efecto bacteriostático sólo en cepas de *P. aeruginosa*.

La acción del cobre no es ajena a los procesos alimentarios ampliando su acción frente a bacterias patógenas, es así que Faúndez *et al.*, (2004) probaron la actividad antimicrobiana de las superficies de cobre en comparación con el acero inoxidable y un polímero sintético frente a suspensiones de 3×10^6 UFC/ml de *Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni* expuestos a temperaturas de 25°C y 10°C. Obtuvieron resultados significativos en superficies de cobre para *Salmonella enterica* mostrando una reducción de viabilidad a las 2 horas, la reducción en UFC/mL fue de aproximadamente 2log, lo suficiente para reducir el inóculo inicial por debajo de la dosis infecciosa para este patógeno. A las 4 horas, el efecto inhibidor fue notable presentando una disminución de 4log y 6log con respecto al inóculo inicial ($t=0$) a 25°C y a las 8 horas la disminución en la concentración de bacterias viables fue de aproximadamente 2log en comparación al inóculo inicial a una temperatura de 10°C. Mientras en *Campylobacter jejuni* a 25°C, la disminución de UFC/mL fue de aproximadamente 4log con 4 horas de exposición; con 8 horas la reducción fue aproximada 5log, alcanzando un UFC/mL por debajo de la dosis infectiva. A 10 °C el efecto inhibidor fue menos intenso, con una disminución en las células viables de *C. jejuni* de aproximadamente 2log a las 8 horas de la exposición a las láminas de cobre, ambos conteos fueron mucho menor en comparación con las superficies control.

2.2. Base teórica

Las Infecciones Intrahospitalarias (IIH) o también Infecciones Asociadas a Atención de Salud (IAAS), son enfermedades adquiridas por un paciente durante la hospitalización, por lo general ocurren a las 48 o 72 horas después del ingreso y 30 días después del alta hospitalaria. Por su alta frecuencia son un gran problema de salud pública, expresado en morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, la carga que imponen al personal sanitario y los sistemas de salud (MINSa 2014; OPS 2012). En América Latina representan un serio problema debido a que la vigilancia es insuficiente y por la resistencia de los microorganismos al tratamiento (Rodríguez *et al.*, 2001).

En el año 2016 por medio del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalaria (SVEIIH) el Ministerio de Salud reportó para 290 establecimientos de salud a nivel nacional, 5970 IIH (Quispe *et al.*, 2017). Entre los patógenos más comunes se encontraron: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*, *Candida sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Acinetobacter baumannii*. (Hidron *et al.*, 2007). En el Perú la Dirección General de Epidemiología reportó en el año 2000 que las bacterias más comunes encontradas en pacientes con IIH fueron *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Frecuentemente, en el ambiente hospitalario los patógenos son diseminados por contacto directo de una persona infectada y un hospedero susceptible, e indirectamente por superficies u objetos inanimados del hospital (Cataño *et.al.*, 2012), un 20% a 40% ha sido atribuido a las manos del personal de salud (Weber *et. al.*, 2010). En relación a los objetos inanimados, éstos facilitan a los microorganismos la formación biofilms que

perduran por largos periodos de tiempo (Prado *et.al.*, 2013), potenciando su capacidad de propagación, esto y la resistencia antimicrobiana contribuyen al incremento de las IIH (Neciosup *et.al.*, 2015). Las medidas de contención para detener y reducir las tasas de infecciones nosocomiales demandan una serie de gastos por parte del estado y solo se reducen a menos de la mitad (MINSA 2009; Vargas 2008).

También es importante señalar que por efecto de la presión selectiva de antibióticos los patógenos han incrementado la resistencia (Madujar *et al.*,2012), con presencia de cepas multidrogorresistentes (MDR) (Giamarellou *et al.*,2012), llegando a presentarse en algunos casos clones panresistentes (Oliver 2009). Agregando su capacidad de proliferación y propagación en superficies u objetos inanimados hacen que estos patógenos sean difíciles de tratar (Morgan *et al.*,2012). Así existen *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Moroney *et al.*,2007). Un estudio en hospitales de Lima en el periodo 2008 - 2009 demostró que las cepas de *S. aureus* aisladas de hemocultivos el 50% fueron resistentes a meticilina (García 2012).

En los últimos años la resistencia a cefalosporinas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se ha ido incrementando, siendo su principal mecanismo la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Hawer *et al.*,2011; Martín *et al.*,2010). Se ha reportado la presencia de cepas bacterianas aisladas de IIH de tracto urinario del Hospital Regional Lambayeque de las cuales se confirmó la producción de BLEE en un 45,5%, donde el 85,7% pertenecía a *E. coli* y el 14,3% a *K. pneumoniae* (Bustamante, 2017).

Pseudomonas aeruginosa y *Acinetobacter sp.* son relacionadas frecuentemente a bacteriemia y neumonía asociada al ventilador (Radice *et al.*,2011; Gonzales – Escalante *et al.*,2013) *P. aeruginosa* es resistente a muchos antimicrobianos (Livermore 2002). Un estudio realizado en varios hospitales de Lima de un total de 113 aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos de hemocultivos. Se encontró que 59% de las cepas eran multidrogoresistentes (MDR) definido como resistente al menos a tres de los siguientes antimicrobianos: ciprofloxacina, imipenem, amikacina y ceftazidime. La resistencia a piperacilina-tazobactam fue de 34,5 %. (García *et al.*,2012).

El cobre es uno de los metales más empleados por la humanidad a lo largo de la historia esto se debe a sus propiedades físicas y químicas tales como su resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, durabilidad y conductividad eléctrica. Las propiedades antimicrobianas se conocen hace buen tiempo, pero en los últimos años, resurge el interés debido al potencial para ser empleado en superficies de contacto e instrumentos del sector salud (Grass *et al.*,2011). En el año 2008 la American Environmental Agency (EPA) nombra al cobre a partir del amplio rango de acción como el único metal con propiedades antimicrobianas capaz de matar bacterias causantes de enfermedades, también la aprobación de diferentes aleaciones como el latón y el bronce (EPA). Se han desarrollado una serie de investigaciones a partir de esta propiedad en patógenos causantes de IHH.

Los mecanismos involucrados en la actividad bactericida del cobre no están totalmente dilucidados. Un factor en la actividad antimicrobiana muy importante es la capacidad para aceptar y ceder electrones en un proceso continuo. Estudios sugieren que el cobre tiene un efecto toxico sobre las bacterias en concentraciones elevadas a causa de la liberación de radicales de hidroperóxido (Gordon *et al.*,1994), probablemente los iones

de cobre sustituyen iones esenciales para el metabolismo bacteriano, interrumpiendo en un inicio con la función de la membrana celular y después distorsionando la síntesis proteica a nivel del citoplasma, provocando la formación de proteínas disfuncionales o modificando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (Rodríguez *et al.*, 1993).

Además, se ha demostrado actividad antiviral del cobre en virus de suma importancia médica, como el virus influenza A, en bajas concentraciones como 0,16 a 1,6 mM mediante la elaboración de filtros con óxido de cobre disminuye el riesgo de transmisión a través de fluidos, siendo la inactivación de enzimas para la replicación viral y daño a nivel de envoltura fosfolípida los principales mecanismos implicados en la actividad viral (Borkow *et al.*, 2007; Sagripanti *et al.*, 1996). En hongos indican la actividad antifúngica del cobre mediante “muerte por contacto” que produce daño en la membrana citoplasmática, facilitando la entrada de iones de cobre, provocando daño y aumento del estrés oxidativo en estas células (Quaranta *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales biológicos

El material biológico estuvo representado por las cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aisladas del Hospital Regional de Lambayeque de procesos infecciosos.

3.1.2. Material metálico

El material metálico estuvo constituido por cobre y acero inoxidable que se obtuvieron comercialmente.

3.1.3. Población y Muestra

La población estuvo constituida por las cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente siendo aisladas de infecciones hospitalarias del Hospital Regional de Lambayeque.

El tamaño de la muestra fue de 108, cifra que fue derivada de la interacción entre las tres especies bacterianas, tres cepas por especie enfrentadas a 6 tiempos de exposición (T1=1min, T2=5min, T3=10min, T4=20min, T5=30min, T6=40min) y dos superficies (cobre y acero inoxidable) considerando 3 repeticiones por cada cepa, se obtuvo un total de 324 unidades experimentales.

3.2. Métodos

3.2.1. Variables de estudio

La variable independiente fue el efecto bactericida de superficies de cobre y acero inoxidable y la variable dependiente fue la inhibición de crecimiento de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *S. aureus* meticilino resistente y *P. aeruginosa* multirresistente.

3.2.2. Tipo de estudio y diseño de contratación de hipótesis

El trabajo de investigación fue de tipo experimental y para contrastar la hipótesis se utilizó un diseño experimental clásico y un diseño experimental de estímulo crecimiento (Alvites 2000).

3.2.3. Recolección de la muestra

Las cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *S. aureus* meticilino resistente y *P. aeruginosa* multirresistente, fueron aisladas de infecciones hospitalarias y proporcionadas por el Hospital Regional de Lambayeque. Posteriormente, las cepas se conservaron en viales con contenido de agar TSA, sellados y almacenados en refrigeración.

3.2.4. Determinación del efecto bactericida de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre las cepas bacterianas

Para la actividad bactericida de las superficies de cobre se siguió el modelo establecido por Noyce *et al.*, 2006a, ya que este modelo permite variaciones y modificaciones en cuanto a procedimientos, en este trabajo se modificaron los tiempos de exposición al metal y el volumen del inóculo bacteriano, además se

añadió el algodón húmedo alrededor de las láminas y el conteo se realizó en placa. Se respetó el fundamento del modelo de Noyce *et al.*, 2006a y se estableció la metodología que se describe a continuación:

3.2.4.1. Preparación del material metálico

En la preparación del material metálico las láminas de cobre y acero inoxidable se obtenidas comercialmente, fueron cortadas del tamaño de 1 cm², posteriormente fueron envueltas en papel y esterilizadas en la autoclave. Luego de haberlas esterilizado se sumergieron en etanol para ser flameadas hasta que se evapore para evitar la formación de óxido. Se utilizaron dos placas Petri acondicionadas, donde las láminas de acero inoxidable fueron utilizadas como control. Para la experimentación tanto las láminas de cobre como de acero inoxidable fueron utilizadas para las tres cepas y tuvieron un estudio por triplicado (Figura 1).

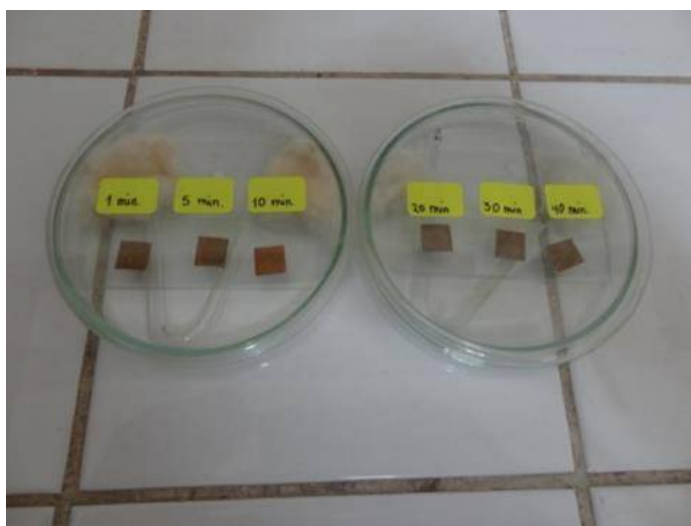


Figura 1. Láminas de cobre y acero inoxidable dentro de las placas acondicionadas.

3.2.4.2. Preparación de inóculos bacterianos

Los viales con las cepas bacterianas, se retiraron del refrigerador y permanecieron a temperatura ambiente. Se transfirió una porción de cada cepa a 2 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C por 16 horas y posteriormente se sembró en agar nutritivo en placa petri e incubó a 37 °C por 18 horas. Confirmada la viabilidad de la cepa, se resembró en agar nutritivo en placa petri e incubó a 37 °C por 18 horas. El crecimiento resultante fue diluido en agua destilada hasta alcanzar concentraciones aproximadas de $2 - 3 \times 10^7$ microorganismos por mL comparándolo con tubo de Mc Farland N° 01 (Figura 2).

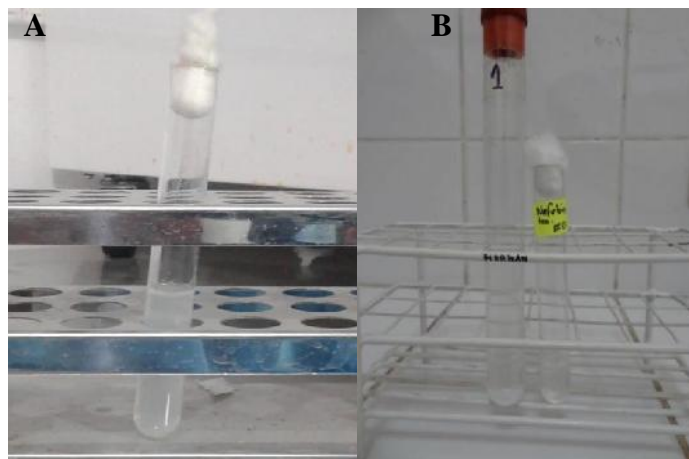


Figura 2. A: Suspensión bacteriana diluida en $2-3 \times 10^8$ UFC. B: Comparación de la suspensión bacteriana con el tubo de Mc Farland N° 01.

3.2.4.3. Preparación de diluciones bacterianas

Se utilizaron tubos de vidrio esterilizados los que se marcaron con los diferentes tiempos a analizar (T1=1min, T2=5min, T3=10min, T4=20min, T5=30min, T6=40min) y luego se ordenaron en una gradilla. Para el acero inoxidable se utilizó una fila de 3 tubos para cada tiempo, uno tuvo 9,99 mL y los otros dos 9 mL de solución salina esterilizada usada en el lavado de las

láminas con las concentraciones a diluir (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) y para el cobre se utilizaron una fila de 2 tubos para cada tiempo, un tubo 9,99 mL y el otro 9 mL de solución salina estéril para el lavado de las láminas con las concentraciones a diluir (10^{-3} y 10^{-4}).

TABLA 01. Diluciones bacterianas con un inóculo bacteriano de 10uL

SSF mL	9.99 mL	9 mL	9 mL
Inóculo bacteriano			
10uL	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

3.2.4.4. Exposición de los inóculos bacterianos sobre las superficies de cobre y acero inoxidable.

Sobre cada lámina de cobre y acero inoxidable se depositó 10 ul de la suspensión bacteriana que contuvo $2-3 \times 10^8$ UFC (Figura 03 A). Cada inóculo fue esparcido sobre cada metal con ayuda de una micropipeta (Figura 03 B). Las láminas metálicas fueron incubadas a temperatura ambiente a diferentes tiempos de exposición ($T_1=1\text{min}$, $T_2=5\text{min}$, $T_3=10\text{min}$, $T_4=20\text{min}$, $T_5=30\text{min}$, $T_6=40\text{min}$).

3.2.4.5. Retiro y siembra de los inóculos bacterianos procedentes de las superficies de acero inoxidable y cobre.

Inmediatamente después de la inoculación se retiró cada lámina para ser lavada dependiendo del tiempo de inoculación. ($T_1=1\text{min}$, $T_2=5\text{min}$, $T_3=10\text{min}$, $T_4=20\text{min}$, $T_5=30\text{min}$, $T_6=40\text{min}$). Para retirar las bacterias de la superficie metálica, cumplido cada tiempo de exposición, se sumergió el metal con el

inóculo dentro del tubo estéril con 9,99 mL de solución salina estéril se agitó levemente siendo esta la dilución 10^{-3} . Se repitió el procedimiento para cada tiempo y cada metal, teniendo en cuenta que para el acero inoxidable fueron 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} respectivamente y para el cobre, 10^{-3} y 10^{-4} (Figura 03 D). Posteriormente, de la dilución 10^{-5} del acero inoxidable y de la dilución 10^{-4} del cobre se sembró en Agar Müeller Hinton e incubó a 37°C por 24 horas, esta operación se repitió por triplicado (Figura 03 E).

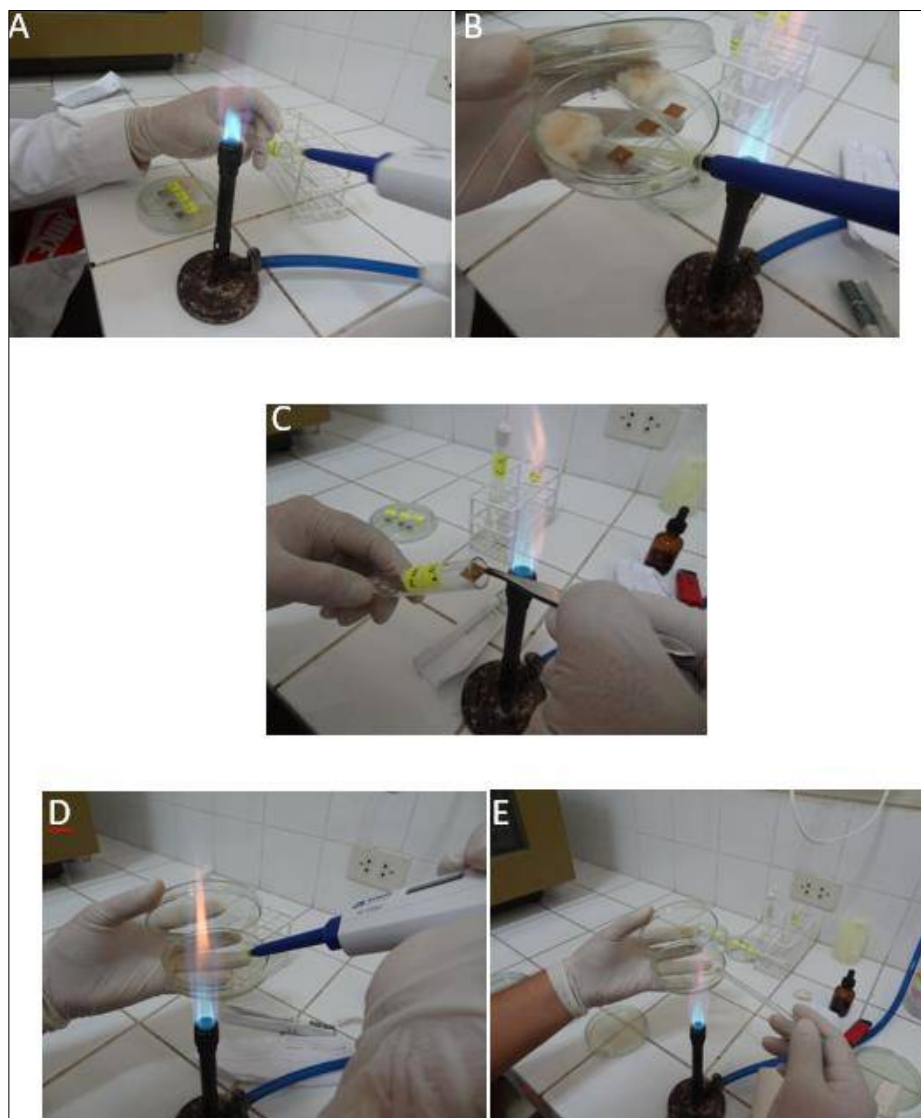


Figura 3. Procedimiento de exposición de inóculos bacterianos sobre las superficies de cobre y acero inoxidable. A: Extracción de 10 uL del inóculo bacteriano. B: Exposición de los 10 uL de inoculo bacteriano. C: Lavado de las láminas de acero inoxidable y cobre. D: Inoculación de la última dilución de acero inoxidable y cobre. E: Siembra del inoculo bacteriano en Agar Müeller Hinton.

3.2.5. Determinación del efecto bactericida de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre las cepas bacterianas según tiempo de exposición

El tiempo necesario para que las superficies de acero inoxidable y cobre eliminen a *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente se determinó mediante el conteo de UFC provenientes de las cepas sobrevivientes.

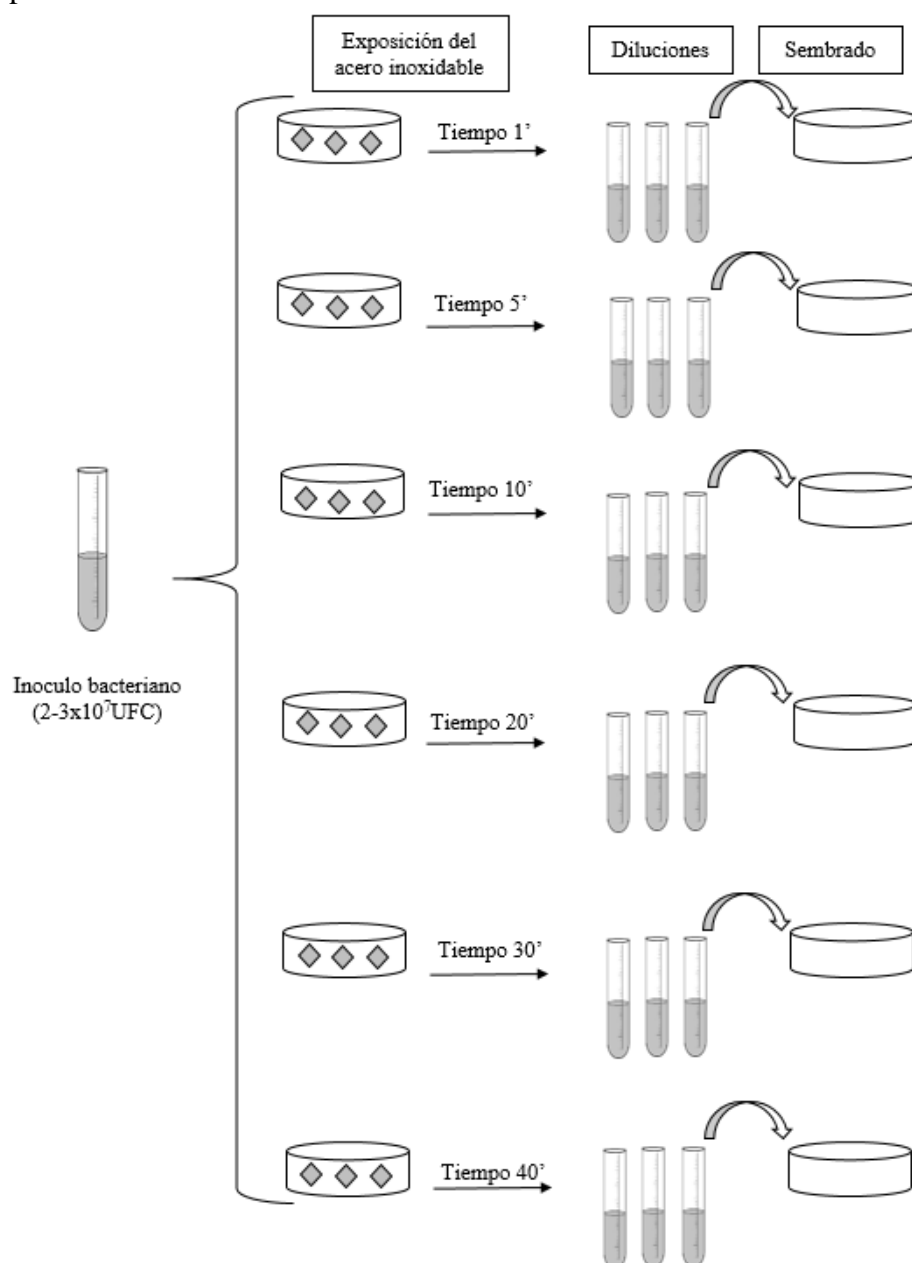


Figura 4. Esquema para evaluar el efecto bactericida y tiempo de exposición de las superficies de cobre y acero inoxidable sobre la cepa bacteriana.

3.2.6. Análisis estadístico de Datos

El efecto bactericida fue evaluado mediante el análisis de Varianza (ANAVA) del diseño factorial 3x3x6x2 (3 especies bacterianas, 3 cepas, 6 tiempos de exposición y 2 metales), mediante el cual se determinó de manera global si el efecto es dependiente o no de las especies, cepas, tiempo de exposición o metales.

El análisis estadístico fue complementado con la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey (0.05), a fin de determinar de manera específica los factores antes mencionados. Se utilizó el software estadístico SPSS Statistics v22.0.0.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se llegó a demostrar la actividad bactericida *in vitro* de las superficies de acero inoxidable y cobre sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aisladas de procesos infecciosos obteniendo diferencias relativas en cuanto a la sensibilidad para cada tipo de bacteria. En una evidencia experimental todas las bacterias fueron eliminadas en menos de una hora.

Los resultados de la Tabla 02, muestran que el recuento de colonias después de 10 minutos de exposición a superficies de cobre fue de cero en las tres cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. Resultados similares se mostraron en la exposición de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a superficies de cobre, aquí se observó una eliminación similar de bacterias iniciales $2-3 \times 10^8$ UFC, en un tiempo aproximado de 10 minutos, por otro lado, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente no hubo crecimiento transcurrido los 10 minutos de exposición. La disminución del número de bacterias viables se redujo conforme aumentaba el tiempo de exposición. Asimismo, en la superficie metálica de acero inoxidable utilizada como control, todas las bacterias en evaluación permanecieron viables después de su inoculación y durante el tiempo de exposición de 40 minutos.

Tabla 02. Promedio de UFC/mL de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente expuestas al efecto bactericida *in vitro* de superficies de cobre y acero inoxidable según tiempo de exposición.

Tiempo(Min)	Promedio (UFC/mL)					
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Cu	Ai	Cu	Ai	Cu	Ai
1	451555	338111	437777	258333	289555	229888
5	45777	331555	114888	272666	30000	208444
10	0	275000	13666	252333	0	202222
20	0	300000	0	219666	0	194000
30	0	308666	0	209888	0	196000
40	0	264666	0	217777	0	161000
Cu: cobre		Ai: acero inoxidable				

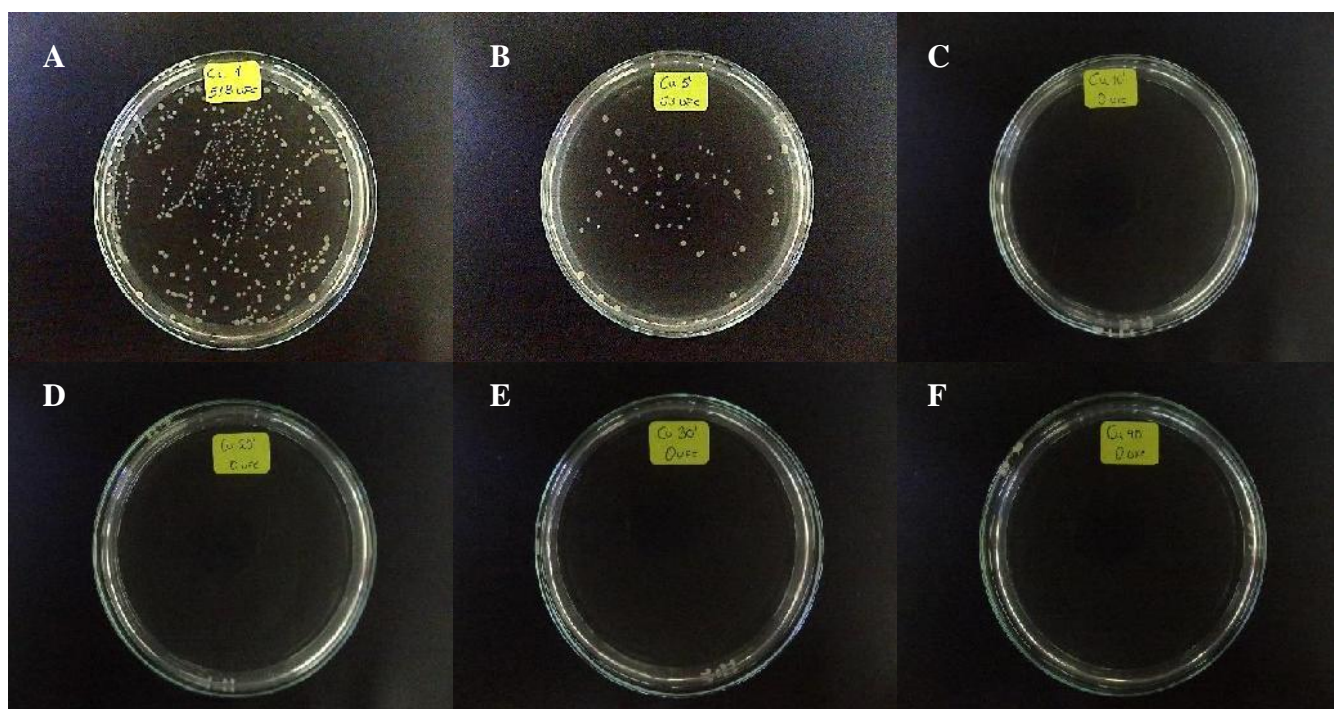


Figura 05. Crecimiento de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas en Mueller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A.1 minuto, B.5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos.

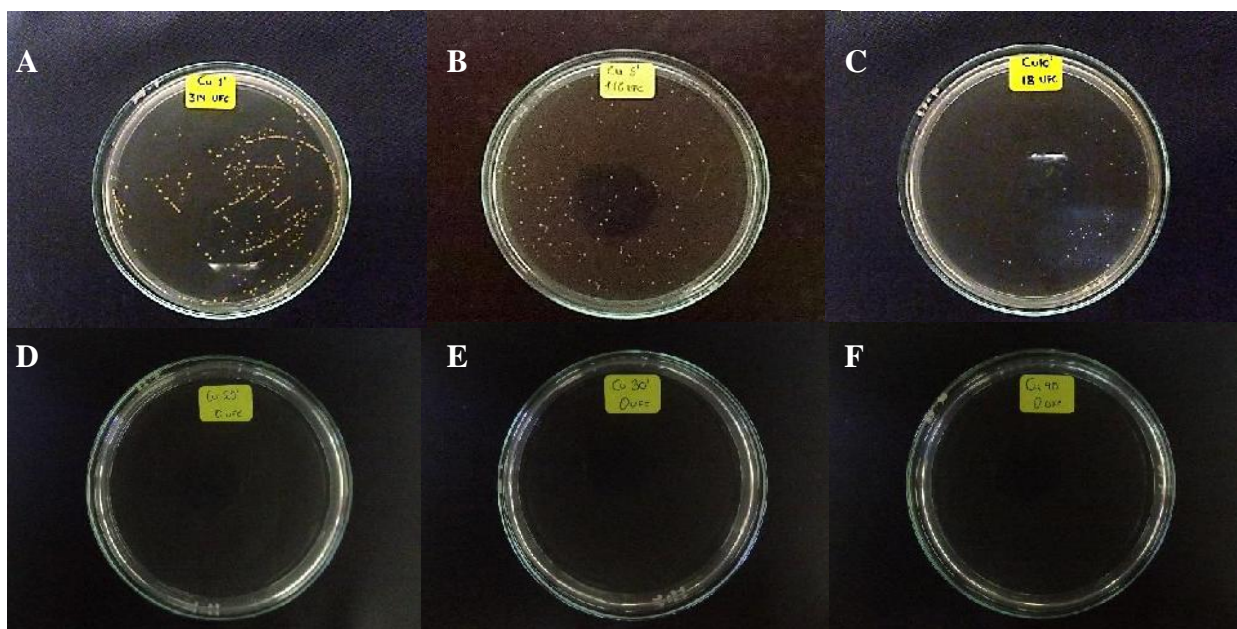


Figura 06. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en Müeller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A. 1 minuto, B. 5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos.

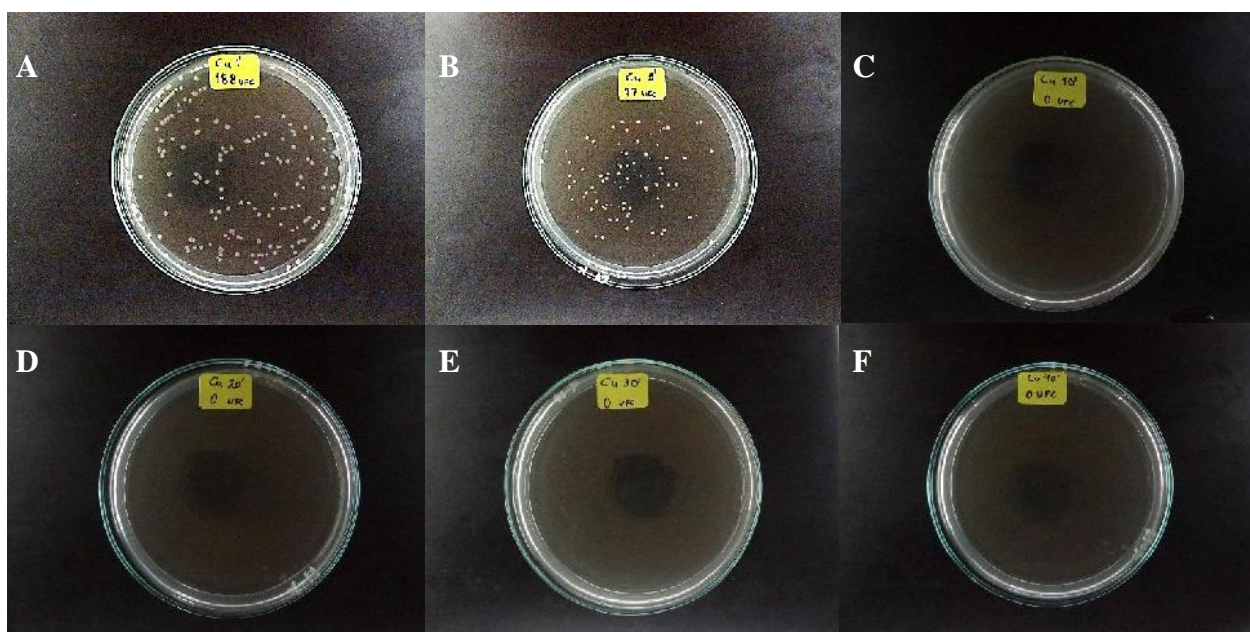


Figura 07. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en Müeller Hinton después de la exposición a superficies de cobre. A. 1 minuto, B. 5 minutos, C. 10 minutos, D. 20 minutos, E. 30 minutos, F. 40 minutos.

El ANAVA (Tabla 03) mostró diferencias significativas entre los promedios de las variables e interacciones de bacteria, metal y tiempo; tomando en cuenta el valor de “P”, que siendo menor que 0.05 se rechazó la hipótesis nula (H_0), en el caso de las interacciones su valor de “P” es menor de 0.05, habiendo diferencias en el efecto de ambos metales, crecimiento de unidades formadoras de colonias durante el tiempo de exposición y diferencias en la respuesta de cada tipo de bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) al contacto con superficies de cobre.

Tabla 03. Análisis de varianza del efecto bactericida de superficies de cobre y acero inoxidable sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Hipótesis

Bacteria: $H_0: C_{(Ec)} = C_{(Sa)} = C_{(Pa)}$

Metal: $H_0: M_{(Cu)} = M_{(Ai)}$

Tiempos: $H_0: T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6$

Interacciones: H_0 : No existe diferencias significativas entre las interacciones

Factores	Ss	df	ms	f	p
Bacteria	674924	8	84365	178,16	0,00
Metal	2301291	1	2301291	4859,92	0,00
Tiempo	1949906	5	389981	823,57	0,00
Especie*metal	403416	8	50427	106,49	0,00
Especie*tiempo	246338	40	6158	13,01	0,00
Metal*tiempo	1431315	5	286263	604,54	0,00
Especie*metal*tiempo	323320	40	8083	17,07	0,00
Error	102281	216	474		
ss: Suma de cuadrados	df: grados de libertad	ms: cuadrados medios			

Los resultados de exposición bacteriana a láminas de cobre y acero inoxidable como control, fueron sometidos a la prueba discriminadora de Tukey en donde se encontró diferencias significativas, determinándose que solo las superficies de cobre influyeron sobre el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* productoras de

betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

Tabla 04: Prueba de significación de Tukey (0.05) para la acción bactericida de superficies de cobre sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, según el metal.

Metal	Ufc/mL	1	2
Cu	76,4567	****	
A.I	245,0123		****

****: Diferencias significativas en la acción bactericida para ambos metales.

Las cepas bacterianas evaluadas son diferentes en cuanto a su sensibilidad frente a las superficies de cobre. En la Tabla 05 se evidencia que la cepa bacteriana con mayor formación de unidades formadoras de colonias es el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en comparación con *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente por grupos separados, indicando que el efecto del cobre fue distinto para cada cepa bacteriana. Así mismo la cepa 2 de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente resultó ser la más afectada por acción del cobre en relación a las demás cepas.

Tabla 05. Prueba de significación de Tukey (0.05) de la acción bactericida de superficies de cobre sobre *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *S. aureus* meticilino resistente y *P. aeruginosa* multirresistente, según la cepa bacteriana.

Cepa	Ufc/mL	1	2	3	4	5
<i>P aeruginosa</i> 2	90,7256		****			
<i>P aeruginosa</i> 3	99,7533		****			
<i>S aureus</i> 3	116,9469				****	
<i>E coli</i> 1	158,1144			****		
<i>S aureus</i> 2	163,5581			****		
<i>P aeruginosa</i> 1	185,5311					****
<i>E coli</i> 3	205,0589	****				
<i>E coli</i> 2	208,1700	****				
<i>S aureus</i> 1	218,7525	****				

Respecto al factor tiempo se demostró estadísticamente que el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente fue disminuyendo significativamente cuando se incrementó el tiempo de exposición a superficie de cobre (Tabla 06). La actividad bactericida de las superficies de cobre fue mayor conforme aumentaba el tiempo de exposición así se pudo observar la disminución de unidades formadoras de colonias en los primero 5 minutos (T₁ y T₂), en comparación con el tiempo (T₃) a los 10 minutos en el caso de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente tubo una disminución lenta, mientras que las cepas bacterianas *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente no mostraron crecimiento en los tiempos (T₃,T₄,T₅ y T₆).

Tabla 06. Prueba de significación de Tukey para la acción bactericida de superficies de cobre sobre *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *S. aureus* meticilino resistente y *P. aeruginosa* multirresistente, según tiempo de exposición.

Tiempos	Minutos	Ufc/mL	1	2	3	4
T ₆	40	107,2457	****			
T ₄	20	118,9494	****	****		
T ₅	30	119,0976	****	****		
T ₃	10	123,8737		****		
T ₂	5	166,0370			****	
T ₁	1	329,2037				****

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación se demostró la actividad bactericida *in vitro* de las superficies de cobre tanto para *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido (BLLE), como para *Staphylococcus aureus* metacilino resistente (MRSA) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente aislados de procesos infecciosos, esto en comparación con el efecto del material más utilizado en el sector salud, es decir el acero inoxidable; que destaca por ser un material resistente a altas temperaturas, fácil limpieza y baja corrosión (Kramer *et al.*, 2006). Revelando que estas superficies de cobre son de utilidad para reducir la adherencia y replicación de bacterias patógenas en el ambiente hospitalario (Page *et al.*, 2009).

Contribuye con lo mencionado estudios en la práctica clínica como el ejecutado en Sudáfrica por Marais *et al.*, (2010) quienes probaron la eficacia del cobre comparando dos ambientes de consulta; el primero implementado con láminas de cobre y el segundo considerando como control superficies originales tales como madera, acero inoxidable y cerámica, habiéndose demostrando también que, en relación a los materiales estándar, las superficies de cobre disminuyen en gran medida la carga microbiana. En tal sentido, los resultados del presente estudio son coincidentes con el mencionado aun cuando el modelo de éste fue un modelo *in vitro*. La explicación sería la carga microbiana, la cual en los ambientes hospitalarios es aproximadamente 6×10^3 (Oie *et al.*, 2002) muy similar a la carga bacteriana utilizada en este trabajo.

Se coincide con los estudios de Neciosup *et al* (2005), Methar *et al* 2008, Prado *et al* 2013, Koseaglu *et al* 2015, Ventura *et al* (2016) y Kloseagu *et al.*, 2016, quienes demostraron la inhibición de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (MDR),

Staphylococcus aureus (MRSA) y *Acinetobacter baumannii* por superficies de cobre, se asume que el efecto es debido a que las superficies poseen mecanismos de acción asignados que incluyen desnaturalización de ácidos nucleicos, peroxidación de la membrana lipídica, alteración e inhibición de ensamble y actividad biológica de proteínas y permeabilización de membrana (Borkow 2009). Debido a la rapidez con la que elimina a los patógenos se estableció el término “contact killing” (muerte por contacto) en el cuál el cobre es disuelto en concentraciones muy pequeñas en forma de iones, estos al entrar en contacto con la bacteria a través de la membrana celular, propicia un desbalance osmótico y la formación de radicales libres que generan tensión trayendo como resultado una destrucción total de ADN y posterior muerte celular (Salgado *et al.*, 2013).

Sin embargo es evidente que la actividad bactericida no es igual para todas las especies, así se determina que las cepas de *Escherichia coli* (BLEE) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente tienen menor tiempo de supervivencia que las cepas de *Staphylococcus aureus* (MRSA), posiblemente se deba a la estructura de la pared celular bacteriana; tanto *E.coli* como *P. aeruginosa* son bacterias gramnegativas en las cuales el producto tiene la posibilidad de afectar tanto la membrana externa que forma parte de la pared celular y la membrana citoplásmica por los mecanismos ya explicados. Complementando, después que el producto daña la pared el siguiente blanco es la membrana citoplásmica cuyo efecto es muy perjudicial por ser una envoltura con actividad biológica, dependiendo de ella la generación de energía, la nutrición, la división celular entre otras; ampliando el daño, el cobre también tendría efecto sobre los componentes celulares citoplásmicos.

En comparación con algunas cepas de *S. aureus* es posible que siendo dicha bacteria grampositiva, el mayor contenido de peptidoglucano que posee su pared celular así como la variabilidad en cantidad y clase de radicales como aminoácidos (L-alanina), azúcares (ramnosa, glucosa, galactosa), aminoazúcares (N-acetil glucosamina) y otros influirá en el grado de daño oxidativo de superficie del cobre sobre la cepa, esto en concordancia con las observaciones de Neciosup *et al.*, (2015), por tanto, se sugiere que el efecto del cobre, tanto en bacterias gramnegativas como en bacterias grampositivas, es dependiente principalmente de la pared celular ya que la estructura de la membrana citoplasmática en ambos tipos de bacterias es similar, consecuentemente se entiende las afirmaciones de Santo *et al.*, (2011) respecto a que la membrana bacteriana no es un buen indicador de daño causado por el contacto con las superficies de cobre pues las bacterias grampositivas y negativas responden de la misma forma.

En este estudio se inhibió el crecimiento de las diferentes cepas de *Escherichia coli* (BLEE), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y *Staphylococcus aureus* (MRSA) en diferentes tiempos a los reportados por autores como Neciosup *et al.*, (2015), Noyce *et al.*, (2006); Ventura *et al.*, (2016); Michels *et al.* (2005); Methar *et al.*, (2008) y Prado *et al.* (2015). Esto probablemente se debe a la cantidad de inóculo, así en esta investigación se usó 10 ul de inóculo a diferencia de los 20 ul empleados por Noyce *et al.*, (2006) y por Methar *et al.*, (2008), al ser menor el inóculo se favorece que todos los microorganismos estén en contacto directo con la superficie del metal, mientras que un inóculo mayor facilitaría la formación de gotas manteniendo algunas bacterias en suspensión en consecuencia evitaría el contacto entre la bacteria y el metal.

También, puede explicarse en los modelos utilizados que favorecen la resistencia del microorganismos como ocurre con el modelo de Prado *et al.* (2015) que al considerar una fase líquida impide inicialmente el contacto directo entre metal y la bacteria, es decir ésta se encuentra en suspensión y no en contacto con el metal, esto favorece que bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* active su sistema de detoxificación de iones cobre el cual estimula el gen PA4778 *CueR* que impulsa la formación de Biofilm el cual protege a la bacteria (Joshua *et al.* 2009).

Otro aspecto influyente son los factores adicionales, en el presente trabajo se trabajó a temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de bacterias, es decir 37°C a diferencia de Michels *et al.*, (2009) cuya investigación la realizó a temperaturas de 20 y 23 °C llegando a la conclusión que el efecto bactericida de los metales disminuye en relación inversamente proporcional a la temperatura, probablemente guarda relación con el crecimiento de la bacteria, ya que en esta fase las estructuras están en formación por tanto el microorganismo es más vulnerable (Faundez *et al.*, 2004).

Aún con la influencia de los factores y con los modelos ensayados, el tipo de cepa es muy influyente en el efecto bactericida del cobre tal y como ocurre con ciertas bacterias gramnegativas que ante la exposición al cobre han generado mecanismos de tolerancia que implican procesos en el citoplasma y el espacio periplásmico como la detoxificación de las formas iónicas del cobre, incluyendo de bombas de expulsión, enzimas oxidativas y presencia de ATPasas como transportadoras del gradiente de protones, que conllevan a la disminución de la toxicidad al alterar el estado de oxidación de los iones de cobre (Kappes *et al.* 2012)

Es importante mencionar que el presente estudio ha demostrado el efecto bactericida de superficies de cobre y acero inoxidable sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente representando una opción tanto para la reducción de infecciones intrahospitalarias como también reducir los costos al sistema de salud. Y por último se podría afirmar la seguridad del cobre en las personas esto debido a la baja sensibilidad que tiene el tejido humano al cobre, todo lo contrario, en los microorganismos los cuáles son mucho más sensibles (Borkow 2005)

VI. CONCLUSIONES

- Las superficies de cobre tienen efecto bactericida sobre *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.
- El efecto inhibitorio de la superficie de cobre sobre las bacterias probadas, estadísticamente es dependiente de la cepa bacteriana y el tiempo de exposición, siendo en este caso directamente proporcional en comparación a la superficie de acero inoxidable que no presento cambios significativos.

VII. RECOMENDACIONES

- Ejecutar investigaciones que permitan determinar el efecto bactericida *in situ* del cobre sobre bacterias en ambientes hospitalarios
- Realizar investigaciones con otros tipos de bacterias resistentes a antibióticos para complementar esta investigación.
- Evaluar la probabilidad de reemplazar con cobre algunas superficies hospitalarias de acero inoxidable como manijas de las puertas, pasamanos de pasillos, barandillas de las camas, llaves de agua, mesas de alimentación comprobando a la vez su eficacia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borkow, G. y Gabbay, J. (2009). Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Curr Chem Biol.* Vol 3:272-278
- Borkow, G., Lara, H., Covington, C., Nyamathi, A., y Gabbay, J. (2007). Deactivation of human immunodeficiency virus type 1 in medium by copper oxide-containing filters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 518–525.
- Bustamante, O. (2017). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* betalactamasa de espectro extendido (Blee) en pacientes con infección intrahospitalaria del tracto urinario. Hospital regional Lambayeque. Enero – julio 2015 (tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Environmental Protection Agency. (2009). Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508P), Reregistration Eligibility Decision (RED) for Coppers. EPA 738-R-09-304,p8.
- Espírito, C., Lam, E., Elowsky, C., Quaranta, D., Domaille, D., Chang, C. y Grass, G. (2010). Matanza bacteriana por superficies secas de cobre metálico. *Microbiología aplicada y ambiental*, 77 (3), 794–802.
- Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, Figueroa G. (2004). Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* vol4:19.
- García, C., Horna, G., Linares, E., Ramírez, R., Tapia, E., y Jacobs, J. (2012). La resistencia a los medicamentos antimicrobianos en el Perú. *Enfermedades infecciosas emergentes* , 18 (3), 520-521.

- Giamarellou, H., Antoniadou, A., y Kanellakopoulou, K. (2008). *Acinetobacter baumannii*: ¿una amenaza universal para la salud pública? *Revista Internacional de Agentes Antimicrobianos*, 32 (2), 106-119.
- Gonzales, E., Vicente, W., Champi, R., Soto, M., y León, S. (2013). Metallo- β -lactamasas en aislamientos clínicos de pseudomonas aeruginosa en Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30(2), 241-245
- Gordon, A., Howell, L. y Harwood, V. (1994). Response of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian journal of microbiology*. 40. 408-411.
- Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2010). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1541–1547.
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Lascols, C., Hackel, M., Hoban, D. J., Badal, R. (2011). Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates from intra-abdominal infections and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3917–3921.
- Hidron, A., Edwards, J., Patel, J., Horan, T., Sievert, D., Pollock, D., y Fridkin, S. (2008). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(11), 996-1011.
- Kappes, T., Domínguez, M., Bello, H., Mella, S., Riedel, G. y González, G. (2016). Actividad de cobre sobre cocáceas grampositivas multi-resistentes a los antibióticos aisladas en hospitales chilenos. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 519-523.

- Koseoglu Eser, O., Ergin, A., y Hascelik, G. (2015). Actividad antimicrobiana de las aleaciones de cobre contra patógenos nosocomiales multirresistentes invasivos. *Microbiología actual*, 71 (2), 291-295.
- Kramer, A., Schwebke, I., y Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC infectious diseases*, 6, 130.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634–640.
- Majumdar, S., Padiglione, A. (2012). Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesthesia and Intensive Care*, 13, 204–8.
- Marais, F., Mehtar, S y Chalkley, L. (2009). Antimicrobial efficacy of copper touch surfaces in reducing environmental bioburden in a South African community healthcare facility. *The Journal of hospital infection*. 74. 80-82.
- Martín, S., Martín, T. y Liso, J. (2010). *Tratamiento de las infecciones producidas por betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Complejo Hospitalario Universitario Infanta Cristina. (Badajoz). España.*
- Methar S., I. Wiid, S. Todorov. (2008). The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *J Hosp. Infect.* 68:45-51.
- Michels H., J. Noyce, C. Keevil. (2009). Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Appl. Microbiology*. 49: 191-195.

- Ministerio De Salud. 2014. Dirección General de Epidemiología. Protocolo: Estudio Prevalencia de Infecciones Intrahospitalarias. Lima- Perú.
- Morgan, D. J., Rogawski, E., Thom, K. A., Johnson, J. K., Perencevich, E. N., y Harris, A. (2012). Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. *Critical care medicine*, 40(4), 1045–1051.
- Moroney, S. M., Heller, L. C., Arbuckle, J., Talavera, M., y Widen, R. H. (2006). Staphylococcal cassette chromosome mec and Panton-Valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 1019–1021.
- Navarro R. (2012). Incidencia de infecciones intrahospitalarias en establecimientos de salud, Perú. Enero 2009 – diciembre 2012. *Bol Epidemiol (Lima)*. 2013; 22 (05): 091–096.
- Neciosup, E., Vergara, M., Pairazamán, O., Apablaza, M., & Esparza, M. (2015). Cobre antimicrobiano contra patógenos intrahospitalarios en Perú. *Anales De La Facultad De Medicina*, 76(1), 9-13.
- Noyce J., H. Michels, And C. Keevil. (2006)a. Potential use of cooper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *Hosp. Infect.* 63:289-297
- Noyce J., H. Michels, and C. Keevil. (2006)b. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* 0157 cross-contamination during food processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4239-4244.
- Oie, S., Hosokawa, I., Y Kamiya, A. (2002). Contaminación de las manijas de las puertas de las habitaciones por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina / resistente a la meticilina. *Diario de la infección del hospital*, 51 (2), 140-143.

- Oliver, A. (2009) Impacto de la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente productora de metalo- β -lactamasas en los hospitales: presente y futuro, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(5),255-256.
- Organización Mundial De La Salud. (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales: guía práctica. Ginebra: OMS.
- Organización Panamericana De La Salud. (2012). Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud. Módulo III: información para gerentes y personal directivo. Washintong.
- Page, K., Wilson, M., y Parkin, I. (2009). Las superficies antimicrobianas y su potencial para reducir el papel del ambiente inanimado en la incidencia de infecciones adquiridas en el hospital. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (23), 3819.
- Prado, V., Esparza, M., Vidal, R. y Durán, C. (2013). Actividad bactericida de superficies de cobre frente a bacterias asociadas a infecciones nosocomiales, en un modelo in vitro de adherencia y sobrevivencia. *Revista médica de Chile*, 141(3), 291-297.
- Prado, V., Vidal, R. y Durán, C. (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Revista médica de Chile*, 140(10), 1325-1332.
- Quaranta, D., Krans, T., Santo, Ce, Elowsky, Cg, Domaille, Dw, Chang, Cj y Grass, G. (2010). Mecanismos de la muerte mediada por contacto de células de levadura en superficies secas de cobre metálico. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 77 (2), 416–426.
- Radice M, Marín M, Giovanakis M, Vay C, Almuzara M, Limansky A, Casellas y Gutkind G. (2011). Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos

- de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Revista argentina de microbiología*, 43(2), 136-153.
- Rodriguez, L., De La Cruz, L., Farías, R. y Massa, E. (1993). Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1144(1), 77–84.
- Salgado, C., Sepkowitz, K., John, J., Cantey, J., Attaway, H. y Schmidt, M. (2013). Las superficies de cobre reducen la tasa de infecciones adquiridas en la atención médica en la Unidad de Cuidados Intensivos. *Control de infecciones y epidemiología hospitalaria*, 34 (05), 479–486.
- Ventura, F., Uceda, C. y Gonzales G. (2016) Actividad bactericida de superficies de cobre sobre bacterias multirresistentes asociados a infecciones intrahospitalarias. *Rev. Exp. Med.* 2(1),13-17.
- Weweber, D., Rutala, W., Miller, M., Huslage, K. y Sickbert, E. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, 38(5), S25–S33.

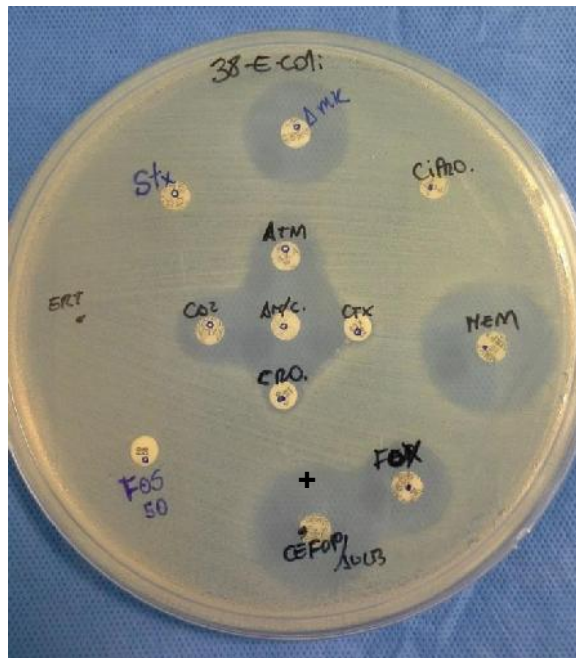
IX. ANEXOS



Figura 8. Placas Petri acondicionas con algodón humedecido utilizadas en la experimentación.



Figura 9. Láminas de acero inoxidable y de cobre flameadas con etanol.



Antimicrobiano	INTERPS
Amicacina	S
Aztreonam	R
Cefotaxima	R
Cefoxitima	S
ceftazidima	R
cextriaxona	R
ciprofloxacino	R
meropenen	S
trimetoprim-sulfametoxazol	R

Figura 10. Antibiograma para *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aislada de una ITU.



Antimicrobiano	INTERPS
ceftazidima	R
cextriaxona	R
Cefotaxima	R
Amoxi/clavulamico	R
Nitrofurantoina	S

Figura 11. Antibiograma para *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente aislada de una herida profunda.



Antimicrobiano	INTERPS
Clindamicina	R
Eritromicina	R
Vancomicina	S
Cefoxitina	S
Oxacilina	S

Figura 12. Antibiograma para *Staphylococcus aureus* metilino resistente aislada de una herida superficial.

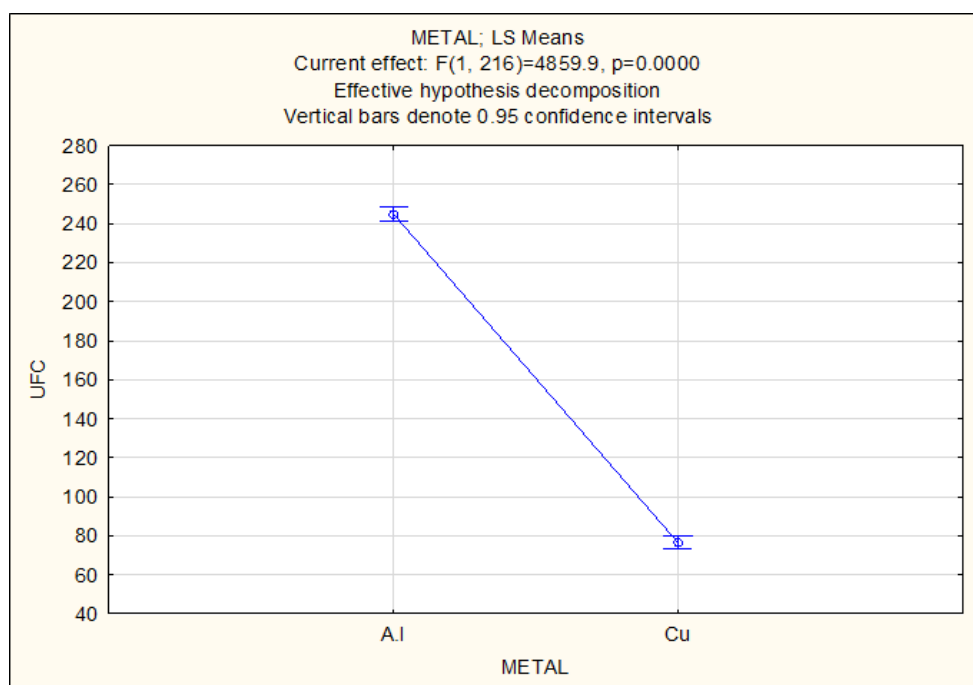


Figura 13. Diferencias del crecimiento bacteriano entre las láminas de cobre en comparación con las láminas de acero inoxidable.

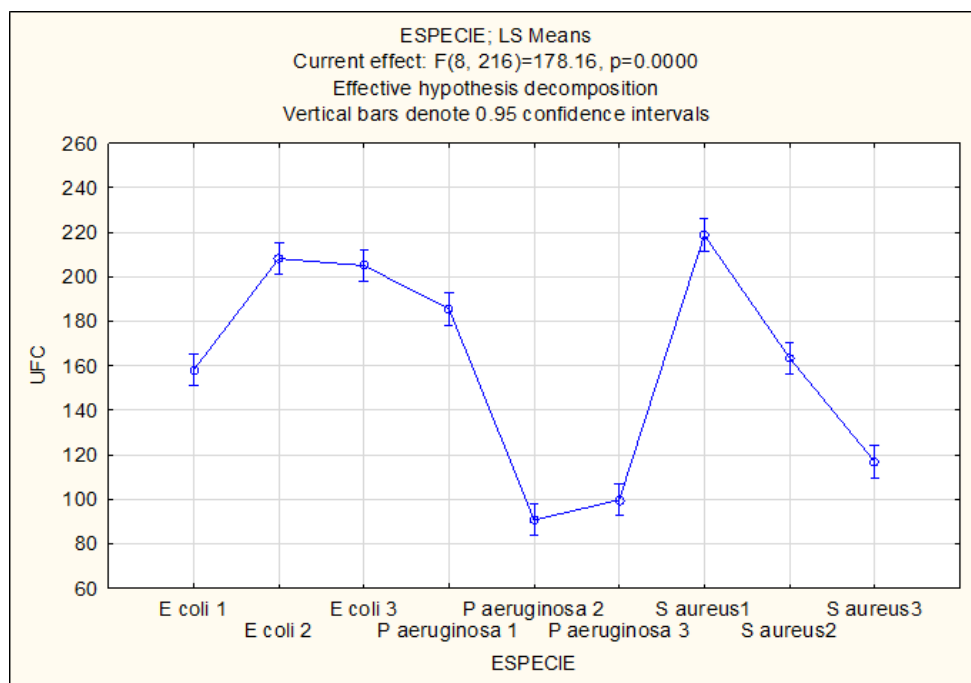


Figura 14. Diferencia del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

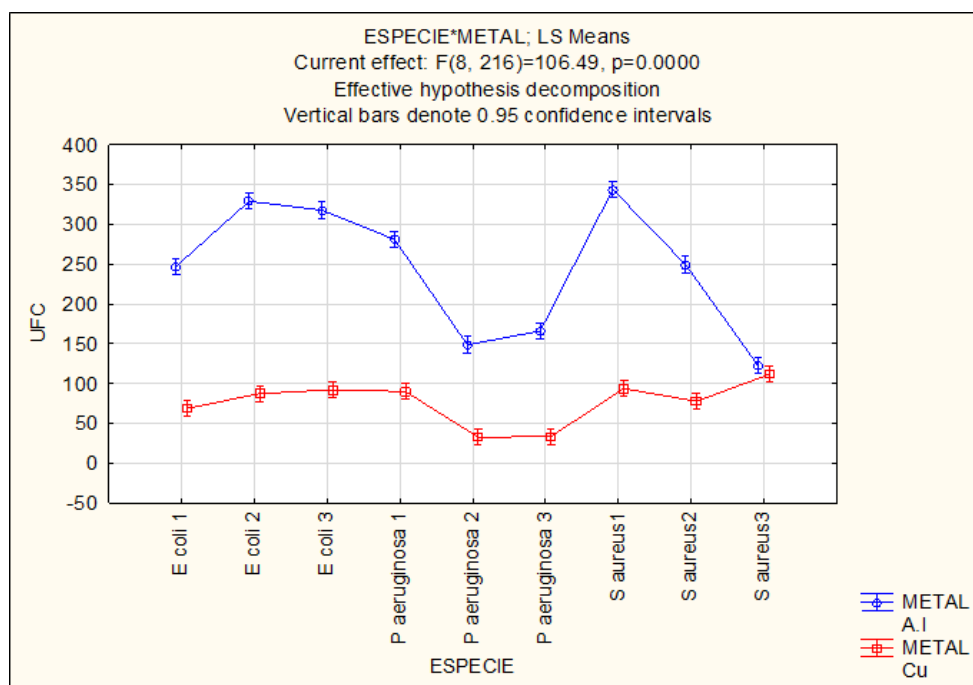


Figura 15. Diferencia del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente como respuesta a su exposición a las láminas de cobre y acero inoxidable.

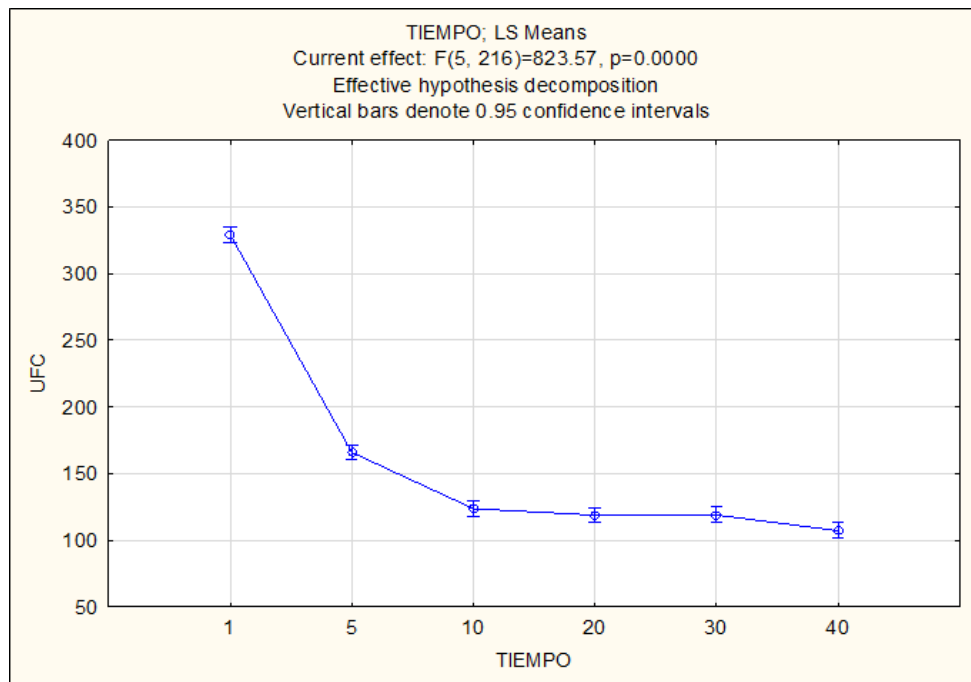


Figura 16. Diferencia del crecimiento bacteriano en comparación al tiempo.

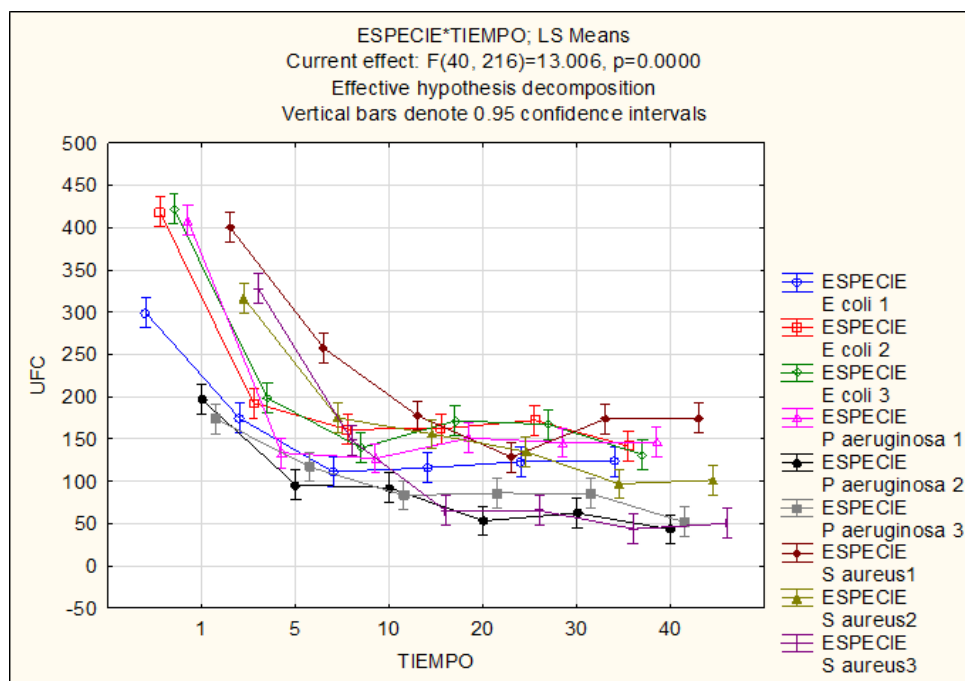


Figura 17. Crecimiento bacteriano de las 9 cepas, 3 *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido, 3 *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y 3 *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

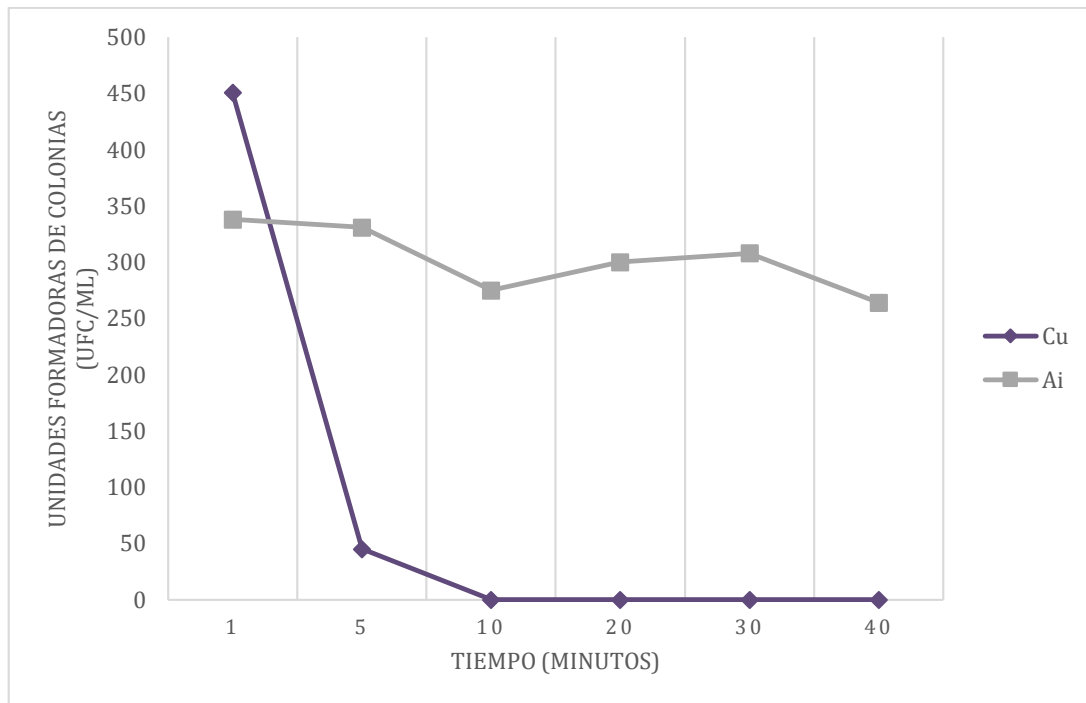


Figura 18. Bacterias de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.

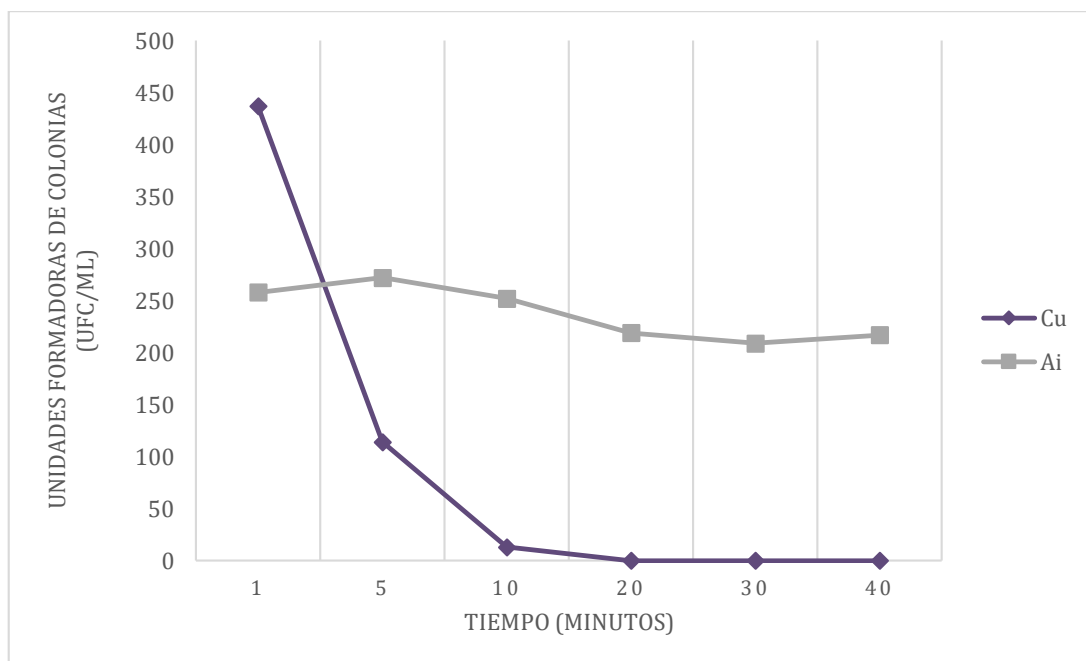


Figura 19. Bacterias *Staphylococcus aureus* metilino resistente viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.

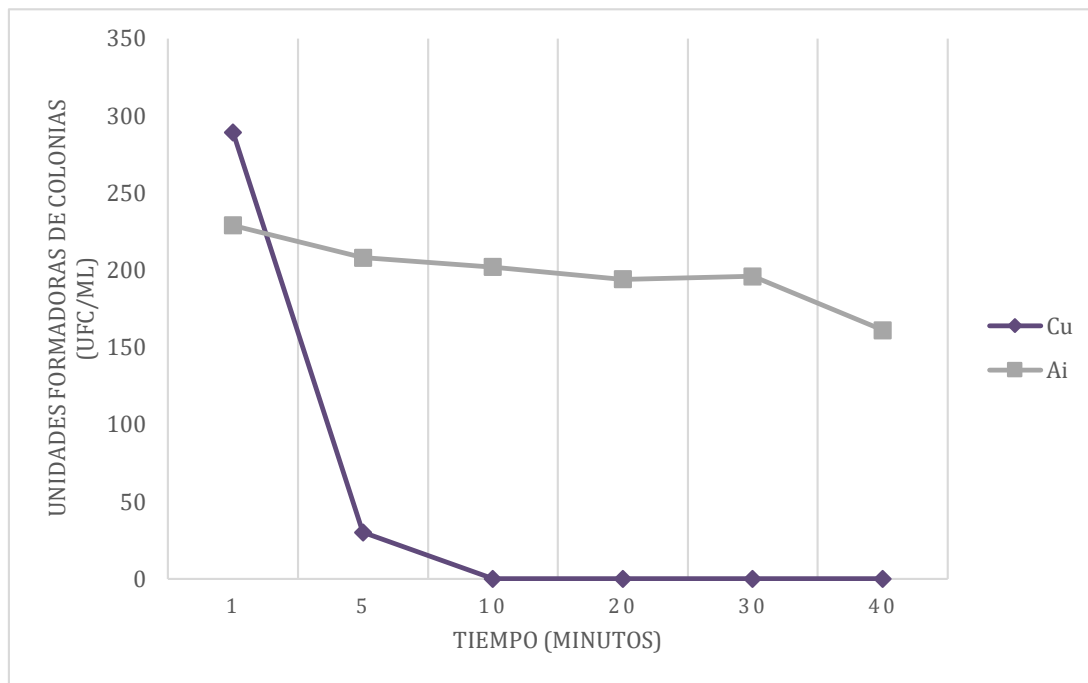


Figura 20. Bacterias *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente viables después de los 40 minutos de exposición a superficies de cobre y acero inoxidable.

Tabla 7. Valores de UFC/mL, teniendo en cuenta el tiempo de exposición de las superficies de cobre y acero inoxidable

METAL	TIEMPO	UFC	1	2	3	4	5	6
Cu	40	0,0000	****					
Cu	30	0,0000	****					
Cu	20	0,0000	****					
Cu	10	4,5622	****					
Cu	5	61,1852				****		
A.I	40	214,4815					****	
A.I	20	237,8889		****				
A.I	30	238,1852		****				
A.I	10	243,1852		****				
A.I	1	265,4444			****			
A.I	5	270,8889			****			
Cu	1	392,9630						****

Tabla 8. Valores de UFC/mL, teniendo en cuenta las cepas bacterianas de la exposición de las superficies de cobre y acero inoxidable.

CEPA	METAL	UFC	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. aeruginosa 2</i>	Cu	32,6178	****								
<i>P. aeruginosa 3</i>	Cu	33,5622	****								
<i>E. coli 1</i>	Cu	68,9511		****							
<i>S. aureus2</i>	Cu	77,7828		****							
<i>E. coli 2</i>	Cu	87,3956		****	****						
<i>P. aeruginosa 1</i>	Cu	90,0622		****	****						
<i>E. coli 3</i>	Cu	92,3400		****	****						
<i>S. aureus1</i>	Cu	93,7272		****	****						
<i>S. aureus3</i>	Cu	111,6717			****	****					
<i>S. aureus3</i>	A.I	122,2222				****					
<i>P. aeruginosa 2</i>	A.I	148,8333					****				
<i>P. aeruginosa 3</i>	A.I	165,9444					****				
<i>E. coli 1</i>	A.I	247,2778						****			
<i>S. aureus2</i>	A.I	249,3333						****			
<i>P. aeruginosa 1</i>	A.I	281,0000							****		
<i>E. coli 3</i>	A.I	317,7778								****	
<i>E. coli 2</i>	A.I	328,9444								****	****
<i>S. aureus1</i>	A.I	343,7778									****

Tabla 9. Resultados de la exposición de 3 cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido a láminas de cobre y acero inoxidable durante 40 minutos.

COBRE					PROMEDIO	Cu	DS	Ai
TIEMPO	CEPAS	REPETICIONES						
		R1	R2	R3				
T1 1min	<i>E. coli 1</i>	330000	337000	391000	352666	451555	85734,0375	338222
	<i>E. coli 2</i>	514000	525000	452000	497000			
	<i>E. coli 3</i>	518000	506000	491000	505000			
T2 5min	<i>E. coli 1</i>	64000	68000	51000	61000	457777	17063,24402	320444
	<i>E. coli 2</i>	23000	30000	29000	27333			
	<i>E. coli 3</i>	63000	31000	53000	49000			
T3 10min	<i>E. coli 1</i>	0	0	0	0	0	0	275000
	<i>E. coli 2</i>	0	0	0	0			
	<i>E. coli 3</i>	0	0	0	0			
T4 20min	<i>E. coli 1</i>	0	0	0	0	0	0	288888
	<i>E. coli 2</i>	0	0	0	0			
	<i>E. coli 3</i>	0	0	0	0			
T5 30min	<i>E. coli 1</i>	0	0	0	0	0	0	308666
	<i>E. coli 2</i>	0	0	0	0			
	<i>E. coli 3</i>	0	0	0	0			
T6 40min	<i>E. coli 1</i>	0	0	0	0	0	0	264666
	<i>E. coli 2</i>	0	0	0	0			
	<i>E. coli 3</i>	0	0	0	0			

Tabla 10. Resultados de la exposición de 3 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente a láminas de cobre y acero inoxidable durante 40 minutos.

COBRE					PROMEDIO	Cu	DS	Ai
TIEMPO	CEPAS	REPETICIONES						
		R1	R2	R3				
T1 1min	<i>S. aureus 1</i>	351000	458000	473000	427333	437777	90785,20968	269444
	<i>S. aureus 2</i>	384000	357000	317000	352666			
	<i>S. aureus 3</i>	528000	548000	524000	533333			
T2 5min	<i>S. aureus 1</i>	130000	121000	114000	121666	114888	12615,201	272666
	<i>S. aureus 2</i>	98000	111000	92000	100333			
	<i>S. aureus 3</i>	122000	130000	116000	122666			
T3 10min	<i>S. aureus 1</i>	18000	12000	10000	13333	13666	333,5001249	252333
	<i>S. aureus 2</i>	12000	20000	9000	13666			
	<i>S. aureus 3</i>	10000	17000	15000	14000			
T4 20min	<i>S. aureus 1</i>	0	0	0	0	0	0	219666
	<i>S. aureus 2</i>	0	0	0	0			
	<i>S. aureus 3</i>	0	0	0	0			
T5 30min	<i>S. aureus 1</i>	0	0	0	0	0	0	209888
	<i>S. aureus 2</i>	0	0	0	0			
	<i>S. aureus 3</i>	0	0	0	0			
T6 40min	<i>S. aureus 1</i>	0	0	0	0	0	0	217777
	<i>S. aureus 2</i>	0	0	0	0			
	<i>S. aureus 3</i>	0	0	0	0			

Tabla 11. Resultados de la exposición de 3 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente a láminas de cobre y acero inoxidable durante 40 minutos.

COBRE					PROMEDIO	Cu	DS	Ai
TIEMPO	CEPAS	REPETICIONES						
		R1	R2	R3				
T1 1min	<i>P. aeruginosa1</i>	568000	516000	528000	537333	289555	214917,3166	229888
	<i>P. aeruginosa2</i>	170000	185000	178000	177666			
	<i>P.aeruginosa3</i>	188000	159000	114000	153666			
T2 5min	<i>P. aeruginosa1</i>	2000	1000	6000	3000	22888	22730,75417	208444
	<i>P. aeruginosa2</i>	18000	24000	12000	18000			
	<i>P.aeruginosa3</i>	57000	45000	41000	47666			
T3 10min	<i>P. aeruginosa1</i>	0	0	0		0	0	202222
	<i>P. aeruginosa2</i>	0	0	0	0			
	<i>P.aeruginosa3</i>	0	0	0	0			
T4 20min	<i>P. aeruginosa1</i>	0	0	0	0	0	0	194000
	<i>P. aeruginosa2</i>	0	0	0	0			
	<i>P.aeruginosa3</i>	0	0	0	0			
T5 30min	<i>P. aeruginosa1</i>	0	0	0	0	0	0	196000
	<i>P. aeruginosa2</i>	0	0	0	0			
	<i>P.aeruginosa3</i>	0	0	0	0			
T6 40min	<i>P. aeruginosa1</i>	0	0	0	0	0	0	161000
	<i>P. aeruginosa2</i>	0	0	0	0			
	<i>P.aeruginosa3</i>	0	0	0	0			