



UNIVERSIDAD MAYOR

Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
APÓSITOS EN BASE A SALES DE COBRE SOBRE PATÓGENOS
ASOCIADOS A INFECCIONES DE HERIDAS CRÓNICAS”**

Trabajo de Investigación para optar al
Título Profesional de Tecnólogo Médico en
Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre

Alumna: María Carolina Ugalde Silva

Tutor: T.M., MSc., PhD. Victor Silva V.

Santiago

Chile

2016

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE APÓSITOS EN BASE A SALES DE COBRE SOBRE PATÓGENOS ASOCIADOS A INFECCIONES DE HERIDAS CRÓNICAS”

Nota Final Trabajo de Investigación: _____

T.M., MSc., PhD. Victor Silva
Profesor Tutor

Profesor Revisor

Profesor Revisor

Representante
Escuela de Tecnología Médica

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia por acompañarme durante todo el proceso del trabajo de investigación, a mi pareja y amigas por animarme en los momentos difíciles y a cada una de las personas que me ayudaron sin esperar nada a cambio.

Y en especial quiero agradecer a mi tutor Victor Silva por guiarme en este camino, a las profesoras Alicia Marcoleta y Viviana Isabel Silva por su colaboración, sin ellos este trabajo no sería el mismo.

María Carolina Ugalde Silva

2016

SOLO USO ACADÉMICO

ÍNDICE

1.-RESUMEN.....	7
2.- INTRODUCCIÓN	8
2.1 Generalidades	8
2.2 Importancia de las heridas crónicas	8
2.3 Manejo de las heridas crónicas	12
2.4 Tipos de apósitos	13
2.5 Criterios para elegir un apósito	
2.6 Actividad antimicrobiana del cobre.....	13
3.- Hipótesis.....	16
4.- OBJETIVOS.....	16
4.1.- Objetivo General.....	16
4.2.- Objetivos Específicos	16
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Modelo del estudio	17
5.2 Cepas incluidas en el estudio	17
5.3 Criterios de inclusión y exclusión	17
5.4 Re identificación de las cepas	18
5.5 Estandarización del inóculo bacteriano en ensayos de actividad antimicrobiana de apósitos.....	18
5.6 Selección del apósito con mejor actividad antimicrobiana.....	19
5.7 Prueba tiempos diferidos.....	21
5.7 Comparación del apósito en base a sales de cobre con apósitos de Plata.....	21
5.8 Control de calidad.....	21
6.- Análisis estadístico.....	22
7.- RESULTADOS.....	23
8.- DISCUSIÓN.....	34
9.- CONCLUSIONES.....	38
10.- ANEXOS.....	39
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	60

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estandarización del inóculo bacteriano en ensayos de actividad antimicrobiana de apósitos	19
Figura 2: Selección del apósito con mayor actividad antimicrobiana	20
Figura 3: Imágenes de la estandarización del inóculo	24

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Nombre de apósitos y nomenclatura utilizada	19
Tabla 2: Diluciones realizadas para obtener un recuento en placa	23
Tabla 3: Porcentajes de inhibición bacteriana	25
Tabla 4: Porcentajes de inhibición de crecimiento en tiempos diferidos	28

LISTADO DE GRAFICO

	Página
Gráfico 1: Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i>	26
Gráfico 2: Inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i>	26
Gráfico 3: Inhibición de crecimiento de <i>M. morganii</i>	26
Gráfico 4: Inhibición de crecimiento de <i>P. alcaligenes</i>	26
Gráfico 5: Inhibición de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	26
Gráfico 6: Inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> , tiempo 90 minutos.	28
Gráfico 7: Inhibición de crecimiento de <i>P. alcaligenes</i> , tiempo 10 minutos.	28
Gráfico 8: Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> , tiempo 60 minutos.	29
Gráfico 9: Inhibición de crecimiento de <i>M. morganii</i> , tiempo 30 minutos.	29
Gráfico 10: Inhibición de crecimiento de <i>S. marcescens</i> , tiempo 20 minutos.	29
Gráfica 11: Inhibición de crecimiento de la familia <i>Staphylococcaceae</i>	31
Gráfica 12: Inhibición de crecimiento de la familia <i>Enterococcaceae</i>	32
Gráfica 13: Inhibición de crecimiento de la familia <i>Streptococcaceae</i>	32
Gráfica 14: Inhibición de crecimiento de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	33
Gráfica 15: Inhibición de crecimiento de la familia BNF	33

LISTADO DE ANEXOS		Página
Anexo 1:	Tabla de diagrama de valoración de Heridas	39
Anexo 2	Listado de cepas seleccionadas para el estudio	40
Anexo 3:	Lectura e interpretación de resultados de galería API® (Biomerieux®)	42
Anexo 4:	Identificación bacteriana	44
Anexo 5:	Tabla de Contingencia y prueba de Chi-Cuadrado	45
Anexo 6:	Tabla de resultados de la selección del apósito con mejor actividad antimicrobiana y cálculos estadísticos	46
Anexo 7:	Tabla Tiempos diferidos y cálculos estadísticos	49
Anexo 8:	Tabla de resultados de comparación de apósitos y resultados estadísticos.	52

SOLO USO ACADÉMICO

1.- RESUMEN

Las heridas crónicas albergan una diversa y compleja microbiota compuesta de comunidades habitualmente polimicrobianas y multirresistentes, lo que genera un problema de salud pública. Las opciones terapéuticas que se aplican en una herida crónica son variadas, encontrándose apósitos pasivos, activos y mixtos. Dentro de los apósitos mixtos se destaca el apósito en base a carbón activado más plata, sin embargo, no existe un consenso que favorezca su uso sobre otros apósitos debido a la discordancia de su actividad *in vitro* e *in vivo*, acompañado además de su peligro de toxicidad. Por esta razón este estudio pretende evaluar una posible alternativa a futuro para el tratamiento de heridas crónicas.

Se realizó un estudio del tipo prospectivo longitudinal que determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de apósitos en base a sales de cobre sobre agentes prevalentes de heridas crónicas infectadas en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Heridas.

Se evaluaron las sales de acetato y nitrato de cobre, incorporadas a matriz de poliéster rayón a través de dos técnicas, inmersión e impregnación.

Se evidenció que los apósitos con acetato y nitrato de cobre, independientemente de su forma de incorporación a la matriz de poliéster rayón, presentan amplia actividad antimicrobiana, siendo mayor en acetato de cobre por inmersión y por impregnación. En relación al aspecto del apósito de poliéster-rayón con la sal de cobre incorporada por estos dos métodos, se pudo evidenciar que la técnica de inmersión aplicada, mantuvo la tonalidad de la matriz de forma más homogénea.

Al comparar su eficacia frente a dos apósitos de plata utilizados en la práctica clínica, se observó que para la familia *Staphylococcaceae* presentó un porcentaje de inhibición promedio de 67% para el apósito de acetato de cobre por inmersión (AT1), para la familia *Enterococcaceae* se observó una inhibición promedio de un 23% y tanto para las familias *Streptococcaceae* como *Enterobacteriaceae* presentan inhibición promedio de un 65%. Bajo este modelo *in vitro*, los apósitos de plata mostraron mayor actividad antimicrobiana en forma significativa. En conclusión, ambas sales de cobre presentan actividad frente a las bacterias con patrones de multirresistencia y el apósito con acetato de cobre presenta menor actividad *in vitro* que los apósitos de plata.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

La piel y los tejidos blandos constituyen la principal barrera estructural de defensa del organismo, protegiendo al hospedero de agresiones y agentes externos. Dicha defensa se lleva a cabo mediante la respuesta inmune innata, que incluye la integridad de la barrera estructural (piel y mucosa), química (pH y ácidos grasos) y biológica (microbiota), la cual evita la llegada y establecimiento de otros microorganismos potencialmente patógenos. La alteración de los mecanismos de defensa locales o bien la pérdida del equilibrio existente entre hospedero y microbiota, favorece el desarrollo de infecciones, tanto por agentes patógenos, como oportunistas [1, 2].

Entre los factores que pueden alterar dicho equilibrio y favorecer el desarrollo de infecciones cutáneas, se encuentran factores propios del hospedero como: humedad y aumento de la temperatura corporal, pérdida de la integridad de la barrera cutánea, uso de antibióticos, enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión arterial y cáncer, así como factores propios de los microorganismos, entre los que destacan expresión de diversos factores de virulencia y resistencia antimicrobiana [2].

2.2 IMPORTANCIA DE HERIDAS CRÓNICAS

Herida se define como toda lesión traumática de piel y/o mucosas, que produce una alteración de las estructuras anatómicas y funcionales normales, lo cual puede ser causado por una pérdida de la integridad epitelial o bien extendiéndose a tejido subcutáneo más profundo con daños a otras estructuras como tendones, músculos, vasos, nervios y huesos. Su etiología puede variar, siendo ocasionada de forma accidental o intencional, como resultado de una patología de base que esté afectando la integridad epitelial [3, 4].

Una vez producida una herida, el organismo intentará recuperar dicha integridad y arquitectura mediante el proceso conocido como cicatrización [5, 6]. La reparación completa de un tejido lesionado, dependerá del tipo de tejido y profundidad de la herida, además del estado de salud del paciente, principalmente relacionado con enfermedades

que produzcan dificultades en el proceso de cicatrización y su asociación con agentes bacterianos [6, 7].

En la actualidad, en el Reino Unido se han descrito alrededor de 100.000 pacientes con úlceras infectadas de un total de 400.000 pacientes con úlceras, con una prevalencia para esta región de 1.48 por 1000 habitantes y con un aumento de un máximo de 3,6% de la población en mayores de 65 años [8, 9].

Por otra parte, en Latinoamérica la prevalencia de heridas crónicas y úlceras oscila en aproximadamente un 1% de la población general, entre úlceras abiertas y cicatrizadas, correspondiendo un 25% a úlceras venosas activas. En Chile, existen escasos datos con respecto a la prevalencia de este tipo de heridas. Las estadísticas disponibles muestran que aproximadamente 160.000 pacientes poseen algún tipo de herida o úlcera, constituyéndose el manejo de este tipo de pacientes en un problema de salud pública nacional [10]. A nivel país, el manejo de heridas crónicas está dirigido principalmente a las úlceras venosas, pie diabético, úlceras hipertensivas y úlceras por presión [11].

Según trabajos previos, datos nacionales y el estudio realizado en la primera etapa del presente proyecto FONDEF se sabe que los microorganismos con mayor prevalencia en infecciones de heridas crónicas pertenecen a las familias: *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae* y al grupo de bacilos no fermentadores (BNF), como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. [1, 12, 13,14].

Las heridas crónicas representan un importante problema sanitario, que genera a su vez grandes complicaciones en la calidad de vida de quienes las padecen, tanto en el ámbito familiar, psicológico, laboral y económico. La carencia de atención de salud oportuna, repercute en períodos de incapacidad laboral más prolongados, tratamientos altamente costosos, hospitalizaciones reiteradas y cirugías que pueden llegar incluso a la amputación, invalidez y en muchos casos, conducir a la muerte del paciente [3].

2.3 MANEJO DE HERIDAS CRONICA

La curación o el manejo de las heridas es un tema tan antiguo como la historia de la humanidad. El hombre de Neandertal en Irak 60.000 años A.C. usó hierbas contra las

quemaduras y según el papiro de Smith, los apósitos datan desde 5000 años A.C. En el antiguo Egipto ya se usaban como apósitos el barro, gomas, resinas, miel, mirra y sustancias oleosas. Por otro lado, Hipócrates trataba las heridas con vino, cera de abejas, roble sagrado, aceite y azúcar, práctica que incluso se mantiene hasta la actualidad [6, 7].

Se puede definir curación como aquella técnica que favorece el tejido de cicatrización en cualquier herida hasta conseguir su remisión. Actualmente, existen dos grandes formas de realizar la curación, la tradicional (CT) y la avanzada (CA).

La CT utiliza solución fisiológica para lavar la herida y gasa tradicional para cubrirla. Esta es una curación que brinda un ambiente seco a la lesión, no adecuado para la cicatrización. La CA se hace igualmente con solución fisiológica para lavar la herida, pero los apósitos que se utilizan son más sofisticados, permitiendo que el lecho de la herida permanezca en un ambiente húmedo fisiológico, favoreciendo el crecimiento celular y permitiendo así una adecuada cicatrización [6].

En la actualidad, hay más de 5.000 productos para el cuidado de heridas. La mayoría de los vendajes modernos contienen materiales que son muy absorbentes, tales como alginatos, espuma, o carboximetilcelulosa. Hay **factores de crecimiento** como plasma rico en plaquetas (PRP) que contiene fibrina y elevadas concentraciones de factores de crecimiento involucrados en la cicatrización, **aderezos a base de miel y ácido hipocloroso a base de productos de limpieza**. Se destacan también la **desbridación**, que se realiza para remover tejidos muertos o interferentes que pudieran retrasar la sanación y conllevar a la infección; **terapia de presión negativa** que también remueve líquido y desechos y **la terapia de oxígeno hiperbárico** que tiene como fin aportar más oxígeno para promover la cicatrización de la herida [15].

Sumado a ello, los pacientes que padecen de estas heridas son tratados frecuentemente con terapia farmacológica sistémica o tópica, debido a que este tipo de heridas se caracteriza por presentar una etiología polimicrobiana aeróbica, acompañada a veces de agentes anaeróbicos, por ende, el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, es el tratamiento clínico farmacológico por excelencia en las heridas crónicas infectadas.

Es importante señalar que el resultado de un cultivo positivo en una herida crónica no es suficiente para indicar el inicio del tratamiento antimicrobiano, sino que debe ir también acompañado de los signos clínicos de infección [13]. Por lo tanto, para la correcta elección del tratamiento, es primordial conocer la severidad y profundidad de la herida crónica junto a la etiología de base del paciente.

Adicionalmente, la prescripción y administración inadecuada del tratamiento antimicrobiano, conlleva a la selección de cepas bacterianas resistentes. Más aún, la remisión de las infecciones de heridas crónicas se dificulta cuando éstas se asocian a microorganismos multirresistentes (MMR), que representan un problema de salud pública a nivel mundial con cada vez menos opciones terapéuticas disponibles [13, 16, 17]. La importancia de la identificación y determinación de sensibilidad de los microorganismos resulta ser determinante al momento del tratamiento de este tipo de patologías.

Además, en muchas heridas crónicas las bacterias persisten formando *biofilm* o biopelículas, el cual corresponde a un ecosistema microbiano organizado conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora frente a la fagocitosis y la acción de los antibióticos. Dicha estructura se traduce en cepas más resistentes a los antibióticos lo que consecuentemente dificulta su erradicación [5, 13, 17].

2.4 TIPOS DE APÓSITOS

Los apósitos son materiales terapéuticos que se aplican sobre una lesión, permitiendo aislar, proteger y optimizar el proceso de cicatrización. Se pueden clasificar según su localización y complejidad.

Según su localización se dividen en **Primario** (en contacto directo con la herida) y **Secundario** (el que va sobre el primario para proteger y sostener). Según su complejidad se dividen en **Pasivos** (gasas, apósito tradicional y espumas), **Activos** (tull, apósitos transparentes, espumas hidrofílicas, hidrocoloides, hidrogel y alginatos) y **Mixtos** (antimicrobianos desodorantes y absorbentes).

Los **apósitos mixtos** son apósitos con diferentes niveles de permeabilidad que combinan las características de los distintos tipos de apósitos y además, tienen incorporado otros componentes, como por ejemplo sales de plata. Dentro de los apósitos mixtos encontramos a los antimicrobianos desodorantes, destacándose el apósito carbón activo con plata, el cual es un apósito compuesto por carbón activado cubierto por una funda de nylon poroso y por partículas de plata en su interior. El carbón activo permite absorber los microorganismos y otras partículas indeseables, como a su vez neutralizar el mal olor. Por su parte, la plata le otorga la capacidad bactericida, debido a que destruye las bacterias adheridas al carbón activado. El carbón se activa al someter carbón nativo a temperaturas entre 800 y 1000°C, lo que permite que esta estructura sólida se volatilice, dejando partículas ionizadas que atraen a otras sustancias ionizadas. Además, la cubierta del apósito se caracteriza por ser suave, no adherente e hipoalergénica [18].

En clínica también se utilizan los apósitos ACTICOAT™ FLEX 3, los que están formados por una capa de poliéster flexible poco adherente recubierto de plata nanocrystalina y el apósito 3M Tegaderm® Ag Mesh, que es un apósito no tejido que contiene sulfato de plata en concentración de 8mg/g de apósito.

Las opciones a utilizar hoy en día son variadas, quedando la decisión en manos de cada centro de atención, lo cual recae principalmente en los recursos que posea cada uno.

2.5 CRITERIOS PARA ELEGIR UN APÓSITO.

Los apósitos o coberturas permiten aislar, proteger y optimizar el proceso de cicatrización, razón por la cual es fundamental realizar una buena elección del apósito que se utilizará en el manejo de las heridas [19]. Los criterios que debe cumplir son los siguientes:

- Mantener un microambiente fisiológico húmedo que favorezca la granulación.
- Debe ser capaz de mantener una barrera que aisle la lesión del medio ambiente y la proteja de contaminación y traumatismos.
- Debe mantener un ambiente térmico fisiológico.
- Permitir el intercambio gaseoso de la herida con su entorno.

- Permitir una adecuada circulación sanguínea.
- Facilitar la eliminación de secreciones y ser capaz de absorberlas.
- Debe ser adaptable, flexible y de fácil manipulación.
- Libre de contaminantes tóxicos.
- Poseer un adhesivo que no dañe la piel circundante ni el tejido de granulación.
- Debe permitir ser retirado sin trauma ni dolor para el paciente.
- Debe favorecer la remoción de tejidos necrótico y/o esfacelado sin dañar el tejido granulatorio.

El apósito ideal no debe:

- Tener acción alergizante o sensibilizante.
- Liberar mal olor.
- Teñir la lesión.

2.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL COBRE

El cobre es un oligoelemento esencial que interviene en numerosos procesos fisiológicos y metabólicos del ser humano. Contribuye a muchos de los métodos que en su conjunto comprenden la curación de heridas, incluyendo inducción de factor de crecimiento endotelial, angiogénesis y expresión más estabilización de proteínas extracelulares de la piel [20].

Actualmente, son reconocidas las potentes propiedades biocidas del cobre, pero en contraste a los apósitos en base a plata, el riesgo de reacciones adversas de la piel debido a la exposición cutánea al cobre es extremadamente baja [21]. La investigación científica hoy disponible ha permitido conocer los mecanismos que explican las múltiples propiedades antimicrobianas del cobre. Es así que disponemos de investigación básica y aplicada sobre su rol antimicrobiano frente a numerosos patógenos para el hombre y los animales, entre ellos, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (MRSA), *Legionella*

pneumophila, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras [22]. Asimismo, la actividad antiviral del cobre ha sido demostrada frente al virus de Inmunodeficiencia Humano Tipo (VIH-1) y el virus de la Influenza Aviar, entre otros. A lo anterior se suma la potente actividad que posee el cobre sobre muchas especies de mohos, algas y levaduras [23].

El cobre tiene actividad inhibitoria sobre los microorganismos en función de su concentración. Es por ello que, dependiendo del tipo de microorganismo y concentración del cobre, éste puede actuar tanto como un agente bacteriostático o bactericida [24]. Los mecanismos antimicrobianos del cobre son complejos, pudiendo actuar a través de múltiples vías, ya sea dentro de las células microbianas como en su membrana. Un factor crítico en la actividad antimicrobiana es la capacidad del cobre de donar y aceptar electrones, derivado de su alto potencial de oxidación y reducción. Esta propiedad electroquímica le permite alterar proteínas dentro de la célula microbiana, modificando sus funciones metabólicas. Los estudios han demostrado además, que el cobre es responsable de inhibir el transporte de electrones a través de la pared celular entre el medio intracelular y el ambiente, siendo capaz de fijarse al ácido desoxirribonucleico (ADN) y desorganizar la estructura helicoidal de esta molécula [22, 25, 26].

En resumen, los mecanismos por el cual el cobre presenta actividad antimicrobiana corresponden a:

- 1) Inhibición o alteración de la síntesis de proteínas, lo que impide que se efectúen procesos claves del metabolismo (actividad bacteriostática).
- 2) Alteración de la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, causando la peroxidación al inducir daño oxidativo de los lípidos, elemento clave en el intercambio de moléculas del medio intracelular al extracelular y viceversa (actividad bacteriostática).
- 3) Destrucción o alteración del ADN de bacterias y virus, pero no a nivel mutagénico. Esta acción genera la pérdida de la capacidad de multiplicarse de los microorganismos (actividad bactericida).

Cualquiera de estos mecanismos atribuidos al cobre, aisladamente o en su conjunto, impide que los microorganismos desarrollen procesos clave para sobrevivir.

Dado estos antecedentes, el presente estudio determinó la actividad antimicrobiana de apósitos en base a sales de cobre sobre patógenos asociados a infecciones de heridas crónicas, con el fin de avanzar hacia el desarrollo de una nueva alternativa terapéutica dirigida a pacientes que padezcan este tipo de injurias.

SOLO USO ACADÉMICO

3.- HIPÓTESIS

Los apósitos en base a sales de cobre presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias prevalentes asociadas a infecciones de heridas crónicas.

4.- OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de apósitos en base a sales de cobre sobre bacterias prevalentes asociadas a infecciones de heridas crónicas de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Heridas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar el procedimiento *in vitro* que permita evaluar cuantitativamente la actividad antimicrobiana de distintos tipos de apósitos en base a sales de cobre, frente a un grupo seleccionado de agentes bacterianos prevalentes en infecciones de heridas crónicas y que presentaron un patrón de multirresistencia.
- Determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana de cuatro tipos de apósitos en base a sales de cobre, frente a un grupo seleccionado de agentes bacterianos prevalentes en infecciones de heridas crónicas y que presentaron un patrón de multirresistencia.
- Seleccionar el apósito en base a sales de cobre que presente la mejor actividad antimicrobiana frente a diversos agentes bacterianos y comparar su efectividad frente a dos apósitos en base a sales de plata.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Modelo de estudio

El presente estudio fue de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y analítico.

5.2. Cepas incluidas en el estudio

Este estudio formó parte de la segunda etapa del proyecto FONDEF **CA13I10225** titulado: “**Desarrollo de apósito en base a cobre para el tratamiento de pacientes portadores de heridas infectadas**”. Se utilizaron cepas provenientes del cepario creado en la primera etapa del proyecto citado, en el cual se recolectaron y procesaron microbiológicamente 73 muestras procedentes de 3 tipos de heridas. Del total de muestras, 46 de éstas presentaron heridas infectadas (según criterio de valoración de la herida [Anexo 1]), aislándose un total de 68 cepas bacterianas [14]. Las cepas seleccionadas para esta etapa del proyecto correspondieron a 40 especies dentro de las cuales se encuentran representantes de la familia *Enterobacteriaceae*, seguido de Bacilos no Fermentadores, familias *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae* y *Streptococcaceae*.

5.3. Criterios de inclusión y exclusión

Se consideraron los patógenos aislados de infecciones de heridas crónicas (obtenidos en la primera fase del proyecto FONDEF ya citado), que presentaron resistencia a dos o más antimicrobianos o al menos una resistencia más un valor intermedio a otro antibiótico, determinado mediante el método de difusión en agar o Kirby Bauer en medio Müller Hinton.

Como se mencionó anteriormente, las especies que se utilizaron en esta investigación, correspondieron a un total de 40 cepas bacterianas pertenecientes a distintas familias, tales como *Staphylococcaceae* (8), *Streptococcaceae* (2), *Enterococcaceae* (2), *Enterobacteriaceae* (13), Bacilos no Fermentadores - BNF (15), de las cuales 17 fueron multirresistentes [Anexo 2].

5.4. Re identificación de las cepas

Cada cepa criopreservada se sembró en placas de cultivo de agar sangre de cordero, luego se incubó a 35-37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó una tinción de Gram a la colonia sospechosa, seguido de una re-identificación de especie mediante estudios fisiológicos, enzimáticos y/o bioquímicos a través de la utilización del método semiautomatizado API® (Biomerieux®), específicamente las galerías API® STAPH para *Staphylococcus* spp, API® 20 STREP para *Streptococcus* spp, API® 20 NE para BNF y 20 E para enterobacterias. La lectura de estas reacciones se realizó visualmente y la interpretación se efectuó con la ayuda del Software de identificación API® (APIWEB™) versión 4.0 [Anexo 3 y 4].

5.5. Estandarización del inóculo bacteriano en ensayos de actividad antimicrobiana de apósitos

Las especies que se utilizaron para la determinación del inóculo correspondieron a representantes de las familias Enterobacteriaceae (*E. coli*), *Staphylococcaceae* (*S. aureus*) y Bacilos no Fermentadores o BNF (*P. aeruginosa*).

Como se observa en la Figura 1, se preparó un inóculo de $D. O_{600nm} = 0,2$ con cepa fresca (18 a 24hrs de incubación) en un tubo con 2 ml de suero fisiológico (S.F). A partir de éste se realizaron 5 diluciones seriadas (de 200 a 2.000.000x), para lo cual se transfirieron 10 µl del inóculo madre al primer tubo con 2 ml de S.F (dilución 200x). Luego, a partir de esta primera dilución, se tomaron 10 µl y se transfirieron al segundo tubo con 2 ml de SF (2.000x) y así sucesivamente hasta la quinta dilución (2.000.000x). Posteriormente, desde cada una de las diluciones realizadas se tomaron 50 µl y se sembraron en agar sangre cordero utilizando el método de rastrillo. Transcurridas 24hrs de incubación, se observó el crecimiento en las placas correspondientes a cada dilución y se determinó aquella dilución que permitiera visualizar colonias aisladas para realizar un recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) macroscópicamente, para así seleccionar el inóculo estandarizado correspondiente a cada grupo bacteriano.

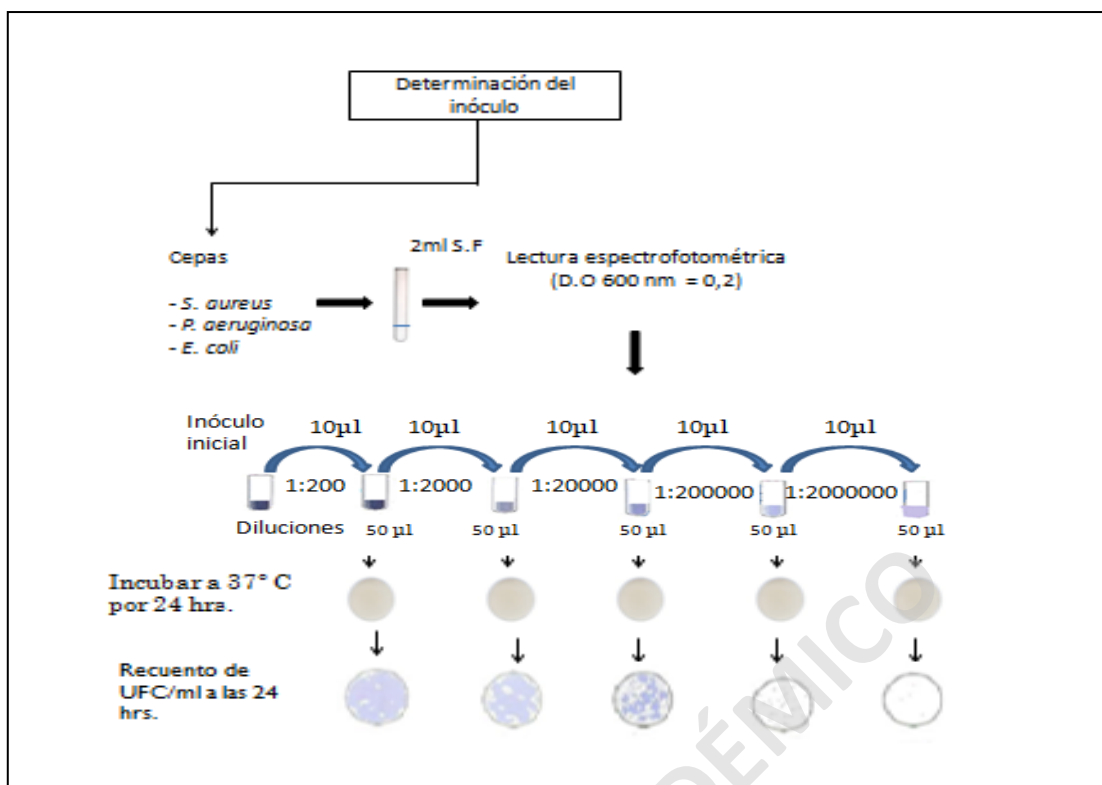


Fig. 1. Esquema del protocolo utilizado en la estandarización del inóculo bacteriano para ensayos de actividad antimicrobiana de apósitos en base a sales de cobre.

5.6. Selección del apósito con mejor actividad antimicrobiana

Se evaluaron inicialmente 4 tipos de apósitos de poliéster-rayón de 3cm² los cuales contenían en forma independiente dos sales distintas de cobre adicionadas por dos métodos (Cuadro 1). Las sales empleadas alcanzaron una concentración de 2.000 µg/mL, definida como actividad bactericida en la fase inicial del proyecto FONDEF CA13I10225. (datos en vías de publicación) y su incorporación varía según la técnica que se emplee [Anexo 5].

TABLA N° 1. Apósitos y nomenclaturas utilizadas

Acetato de cobre por inmersión	AT1
Nitrato de cobre por inmersión	AT2
Acetato de cobre por impregnado	AT3
Nitrato de cobre por impregnado	AT4
Cuadrante control	C.C

En este ensayo se utilizaron 5 cepas bacterianas multirresistentes: *E. coli* (M64C3), *S. aureus* (M70), *M. morgani* (M41C1), *P. alcaligenes* (M71C2) y *P. aeruginosa* (M65C3) [Anexo 2]. Para esto, se tomaron 50 μ l del inóculo estandarizado (en el punto 5.5) de cada una de las cepas multirresistentes seleccionadas y se sembraron cada una en placas de agar Müeller Hinton por duplicado, mediante la técnica de siembra en rastrillo. En las placas ya sembradas, se incorporaron los apósitos en estudio AT1, AT2, AT3 y AT4, por medio de la técnica de impresión durante 2 hrs a 37°C. Posteriormente, se retiraron los apósitos y re incubaron por otras 22 y 44 hrs, realizando en ambos tiempos los recuentos respectivos en UFC/cm² en los cuadrantes de 3cm² correspondientes a cada uno de los apósitos al interior de la placa Müeller Hinton (Figura 2).

Para la determinación del apósito con mejor actividad antimicrobiana, se consideró el apósito que generó una disminución significativa de UFC/cm² en la placa al compararlo con un cuadrante control de crecimiento (C.C) de 3cm², el cual no tuvo contacto con apósitos.

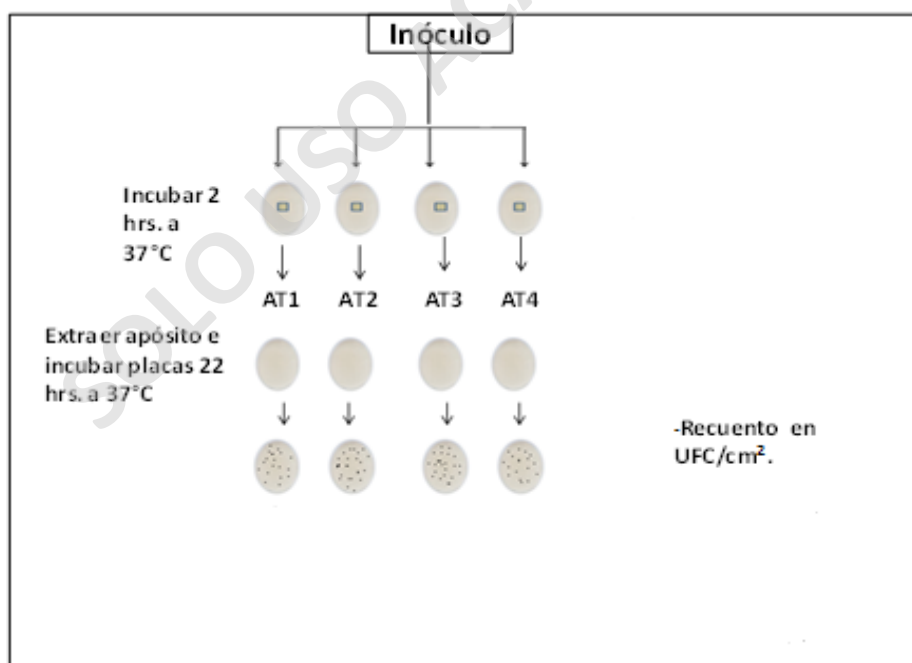


Fig.2 Flujograma utilizado para la selección del apósito con mejor actividad antimicrobiana. AT1 y AT3 acetato de cobre por inmersión e impregnación, respectivamente. AT2 y AT4 nitrato de cobre por inmersión e impregnación, respectivamente.

5.7. Prueba tiempos diferidos

Para determinar el apósito con mejor actividad antimicrobiana, se realizó una prueba adicional denominada "Tiempos Diferidos". Dicha prueba consistió en realizar el protocolo descrito en el punto 5.6, modificando solamente los tiempos de contacto de los apósitos sobre las placas inoculadas. Las especies que se utilizaron y los tiempos de incubación empleados fueron *S. aureus* (M9) 90 minutos, *P. alcaligenes* (M71C2) 10 minutos, *E. coli* (M22) 60 minutos, *M. morgani* (M41C1) 30 minutos y *S. marcescens* (M60C2) 20 minutos. Estos tiempos fueron seleccionados al azar con el fin de determinar la actividad del cobre en tiempos diferidos frente a las bacterias, entregando así una visión de su potencial antimicrobiana frente a especies bacterianas representantes de cada familia de microorganismo.

5.8. Comparación del apósito en base a sales de cobre con apósitos de plata.

Luego de seleccionar el apósito con sal de cobre que presentó mejor actividad antimicrobiana, se realizó un ensayo con el total de las 40 cepas seleccionadas en triplicado, el que permitió comparar la actividad antimicrobiana de éste apósito con dos apósitos de plata usados regularmente en el tratamiento de heridas. Los apósitos de plata correspondieron al apósito ACTICOAT™ FLEX 3 formado por una capa de poliéster flexible poco adherente recubierta de plata nanocrystalina y apósito 3M Tegaderm® Ag Mesh, que es un apósito no tejido que contiene sulfato de plata en concentración de 8mg/g. Para ello se utilizó una placa plato que permitió albergar los 4 apósitos de 3 cm² cada uno, aplicando el protocolo descrito en el punto 5.6, modificando sólo la cantidad de inóculo a 100 µl por poseer esta placa una mayor superficie.

5.9. Control de calidad

Para la realización del control de calidad se utilizaron las cepas ATCC (American Type Culture Collection), catalogadas, caracterizadas y de origen conocido (Tabla N°3). El control de calidad se aplicó a la técnica de Gram, medios de cultivo y Galerías API. Las cepas utilizadas correspondieron a:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™)
- *Enterococcus faecalis* ((ATCC® 29212™)
- *Enterococcus faecium* (orla-jensen) (ATCC® 19434™)
- *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™)

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en el estudio se ordenaron y analizaron estadísticamente con medidas de tendencia central, evaluándose mediante diferentes métodos de comparación, descripción y estandarización con el fin de obtener el apósito con mayor efectividad frente a las bacterias asociadas a infecciones de heridas crónicas. Para esto, se utilizó la prueba del Chi-Cuadrado, considerando un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$), mediante el software SPSS versión 22 [Anexo 6].

7.- RESULTADOS

Luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión (descritos en el punto 5.2) a las 68 cepas obtenidas en la primera etapa del proyecto FONDEF CA13I10225 (2014-2016), se seleccionó un total de 40 cepas en base a su patrón de sensibilidad/resistencia, provenientes de úlceras venosas (34) y úlceras de pie diabético (6). La distribución de los grupos bacterianos que se estudiaron contempló *Staphylococcaceae* (8), *Streptococcaceae* (2), *Enterococcaceae* (2), *Enterobacteriaceae* (13), Bacilos no Fermentadores - BNF (15), dando el total de 40 cepas, de las cuales 32 presentaron resistencia a dos o más antimicrobianos y 8 mostraron resistencia a un antibiótico y a lo menos un valor intermedio.

7.1. Estandarización del inóculo bacteriano

Esta prueba tuvo por objeto estandarizar la dilución que permitiera realizar un recuento en UFC/mL. Las especies que se utilizaron correspondieron a representantes de las familias *Enterobacteriaceae* (*E. coli*), *Staphylococcaceae* (*S. aureus*) y bacilos no fermentadores o BNF (*P. aeruginosa*). Se realizaron 5 diluciones según el protocolo descrito en el punto 5.5. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la [Tabla N° 1] y [Figura 3].

Tabla N°2. Diluciones realizadas para obtener un recuento de UFC en placa

Cepa /Dilución	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>E. coli</i> (M22)		X			
<i>P. aeruginosa</i> (M7)			X		
<i>S. aureus</i> (M70)		X			

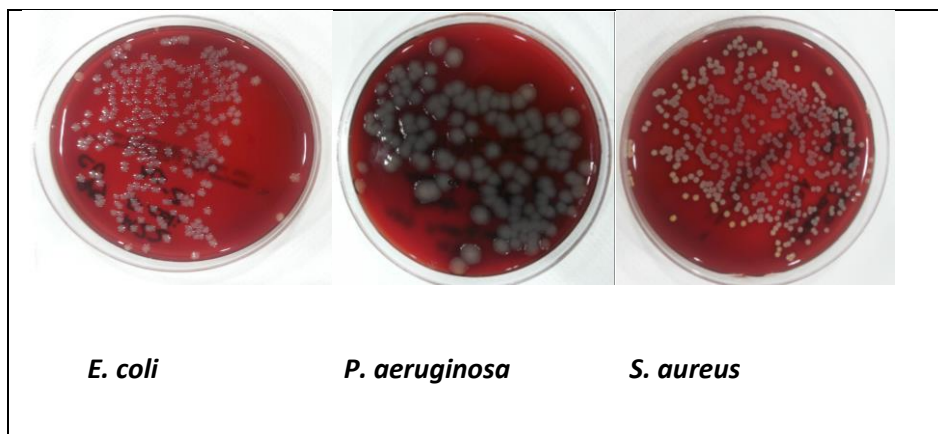


Fig. 3 Fotografías que registran las diluciones seleccionadas que permitieron un recuento de UFC en placas, *E. coli* 10^{-2} , *P. aeruginosa* 10^{-3} y *S. aureus* 10^{-2} .

7.2 Selección del apósito con mejor actividad antimicrobiana

En este ensayo, se utilizaron 5 cepas bacterianas multirresistentes correspondientes a muestras clínicas incluidas en el estudio: *E. coli* (M64C3), *S. aureus* (M70), *M. morgani* (M41C1), *P. alcaligenes* (M71C2) y *P. aeruginosa* (M65C3). Estas bacterias fueron expuestas a los apósitos acetato de cobre por inmersión, nitrato de cobre por inmersión, acetato de cobre por impregnación y nitrato de cobre por impregnado. Los resultados se obtuvieron al comparar el porcentaje de inhibición promedio entre cada uno de los apósitos y el cuadrante control [Anexo 6].

Para *E. coli* (M64C3) se observó actividad inhibitoria de crecimiento de los 4 apósitos, siendo más activo AT4 y AT2, correspondiente a nitrato de cobre por impregnado e inmersión, al calcular el valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre los apósitos frente al agente, $P > 0,05$ (Gráfico 1). Por otra parte, se observó una actividad inhibitoria de crecimiento de los 4 apósitos frente a *S. aureus*, siendo más activo AT3 correspondiente a acetato de cobre por impregnado, seguido por AT4 que lleva incorporado nitrato de cobre por impregnado. Al calcular el valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre los apósitos frente al agente, $P > 0,05$ (Gráfica 2). En el caso de *M. morgani* se muestra actividad inhibitoria de crecimiento de los 4 apósitos, siendo más activo AT3 y AT1 correspondientes a acetato de cobre por impregnado e inmersión. Al calcular el valor

P se obtuvo que no hay significancia estadística entre los apósitos frente al agente $P > 0,05$ (Gráfica 3).

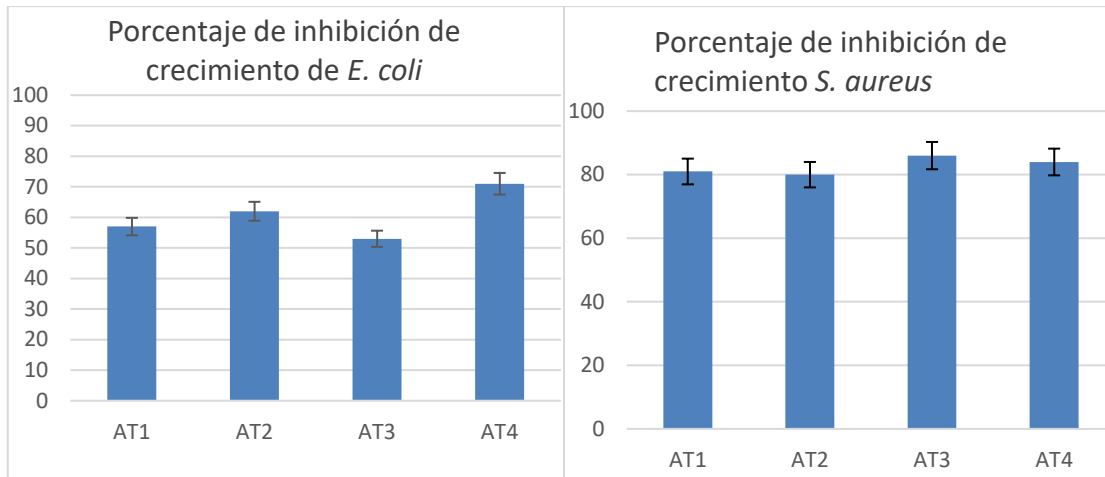
P. alcaligenes mostró actividad inhibitoria de crecimiento de los 4 apósitos, siendo más activo AT3 y AT1 correspondiente a acetato de cobre por impregnado e inmersión. Al calcular el valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre los apósitos frente al agente $P > 0,05$ (Gráfica 4). En cuanto a la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa*, se observó actividad inhibitoria de crecimiento de los 4 apósitos, siendo más activo AT1 correspondiente a acetato de cobre por inmersión, AT2 que tiene incorporado nitrato de cobre por inmersión y AT3 que posee acetato de cobre por impregnado. Al calcular el valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre los apósitos frente al agente $P > 0,05$ (Gráfica 5).

En base a los resultados, se observó que los apósitos con acetato y nitrato de cobre presentan actividad antimicrobiana frente a las distintas bacterias, siendo más y menos eficiente frente a *P. aeruginosa* y *M. morgani*, respectivamente. Acetato de cobre por inmersión y por impregnación (AT1 y AT3) presenta mayor actividad que el nitrato de cobre, sin ser esta diferencia significativa ($P > 0,05$). Cabe mencionar que estos dos apósitos corresponden a la misma sal de cobre, diferenciados sólo en la técnica de incorporación del mismo a la matriz de poliéster-rayón.

Tabla N°3: Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano

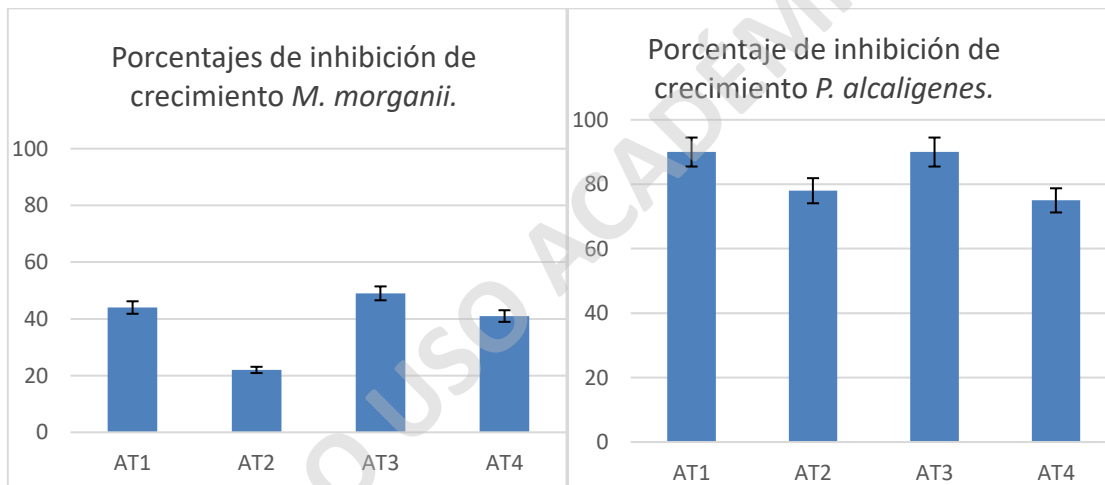
Especie/ Apósito	AT1	AT2	AT3	AT4
<i>E. coli</i> (M64C3)	57%	61%	52%	70%
<i>S. aureus</i> (M70)	82%	80%	86%	85%
<i>M. morgani</i> (M41C1)	43%	21%	49%	40%
<i>P. alcaligenes</i> (M71C2)	88%	76%	88%	76%
<i>P. aeruginosa</i> (M65C3)	88%	88%	88%	82%
Promedio de inhibición*	72%	65%	73%	71%

AT1 acetato de cobre por inmersión, AT2 nitrato de cobre por inmersión; AT3 acetato de cobre por impregnado y AT4 nitrato de cobre por impregnado. * $P > 0.05$.



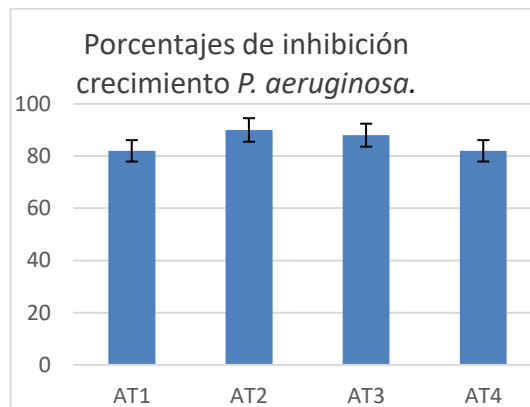
Gráfica 1: porcentaje de inhibición de crecimiento de *E. coli*.

Gráfica 2: porcentaje de Inhibición de crecimiento de *S. aureus*.



Gráfica 3: inhibición de crecimiento de *M. morgani*.

Gráfica 4: inhibición de crecimiento de *P. alcaligenes*.



Gráfica 5: inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa*.

7.3 Prueba tiempos diferidos

En base a los datos de actividad antimicrobiana, se seleccionaron los apósitos de poliéster-rayón con acetato de cobre por inmersión (AT1) y por impregnación (AT3) por poseer mayor efectividad que los apósitos con nitrato de cobre. Los resultados de inhibición de crecimiento promedio en tiempos diferidos comparados con el cuadrante control se presentan en la Tabla N°4.

Tabla N° 4: Porcentajes de inhibición de crecimiento en tiempos diferidos

Especie /Apósito	AT1	AT3
<i>S. aureus</i> (M9) 90 min.	81 %	85%
<i>P. alcaligenes</i> (M71C2) 10 min.	90%	81%
<i>E. coli</i> (M22) 60 min.	82%	76%
<i>S. marcescens</i> (M41C1) 60 min.	92%	91%
<i>M. morgani</i> (M60C2) 30 min.	43%	49%
Promedio	78%	77%

AT1 acetato de cobre por inmersión y AT3 acetato de cobre por impregnado.

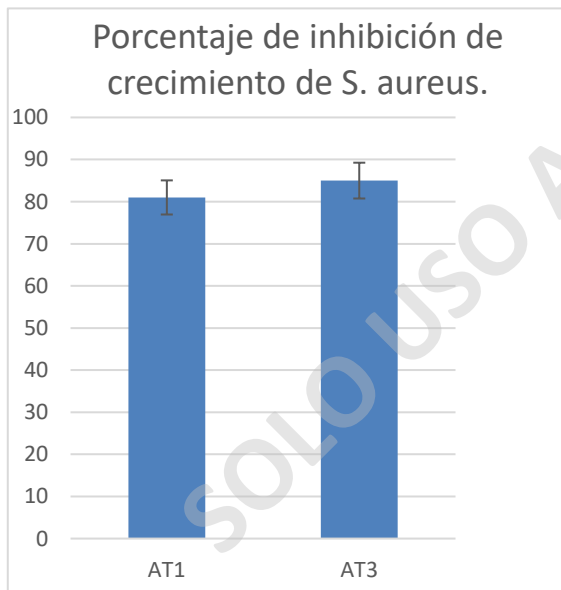
*P>0.05

Ambos apósitos evidencian amplio espectro de actividad antimicrobiana al evaluar su acción inhibitoria de crecimiento frente a representantes de distintas familias bacterianas. Los tiempos estipulados al azar sirvieron para corroborar el potencial de los apósitos en base a sales de cobre que comienza a ser efectivo sobre las cepas bacterianas al poco tiempo de haberlas expuesto a los apósitos.

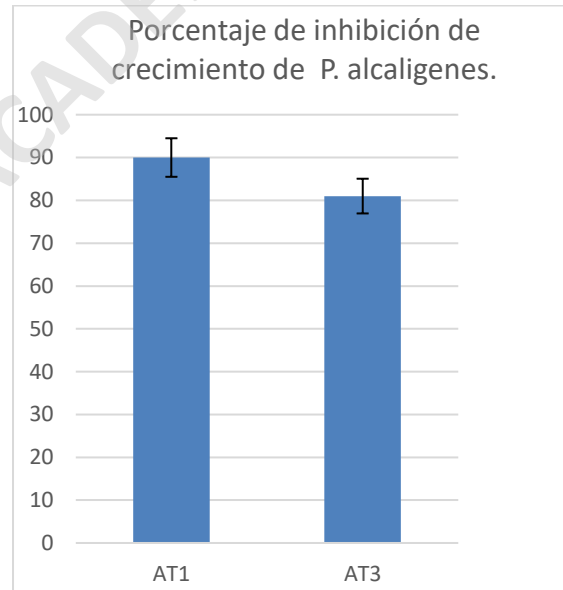
Con respecto a *S. aureus* se observó predominio en actividad inhibitoria de crecimiento de AT3. Al calcular valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre estos apósitos, P>0,05 (Gráfica 6). En cuanto a *P. alcaligenes*, tiempo 10 min. mostró predominio en actividad inhibitoria de crecimiento de AT1. Al calcular valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre estos apósitos, P>0,05 (Gráfica 7). Por su parte *E. coli*, tiempo 60 min. evidenció predominio en actividad inhibitoria de crecimiento de AT1. Al calcular valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre estos apósitos, P>0,05 (Gráfica 8). La inhibición de crecimiento de *S. marcescens*, tiempo 20 min. mostró un

predominio porcentual de AT1. Al calcular valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre estos apósitos, $P > 0,05$ (Gráfica 9). Finalmente *M. morgani*, tiempo 30 min. mostró predominio en actividad inhibitoria de crecimiento de AT3. Al calcular valor P se obtuvo que no hay significancia estadística entre estos apósitos, $P > 0,05$ (Gráfica 10).

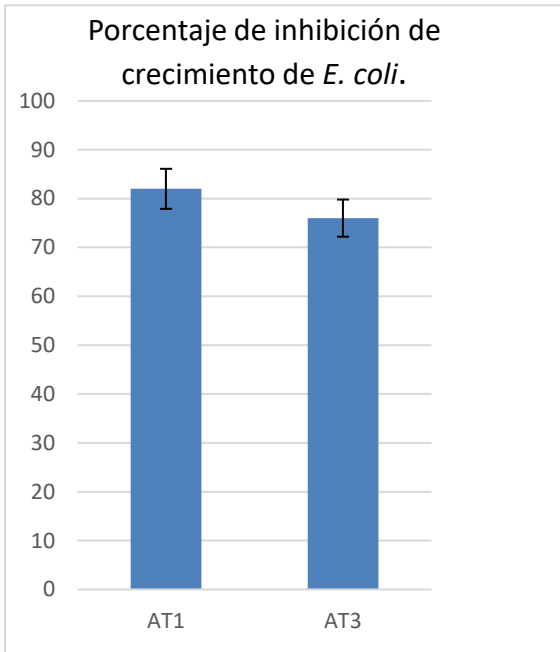
En relación al aspecto del apósito de poliéster-rayón con la sal de cobre incorporada por estos dos métodos, se pudo evidenciar que la técnica de inmersión aplicada en AT1, mantuvo la tonalidad de la matriz de forma más homogénea, en cambio la técnica de impregnado manchó esta matriz, razón por la cual se seleccionó AT1 por sobre AT3 al poseer éste mejores competencias.



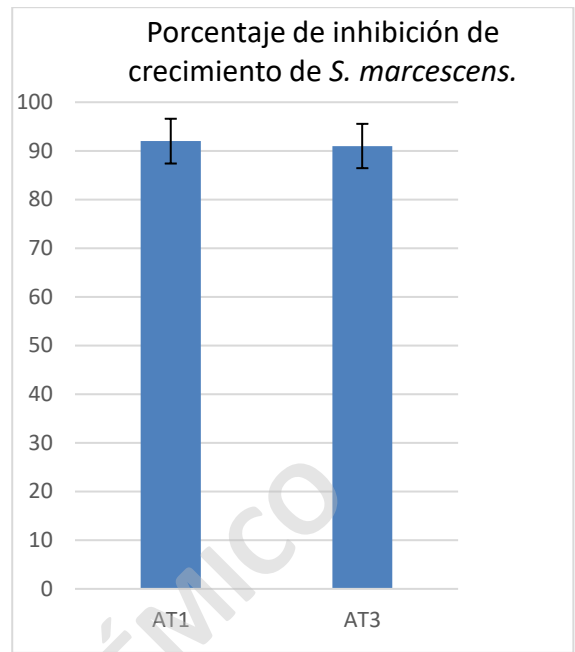
Gráfica 6: Inhibición de crecimiento de *S. aureus*, tiempo 90 min.



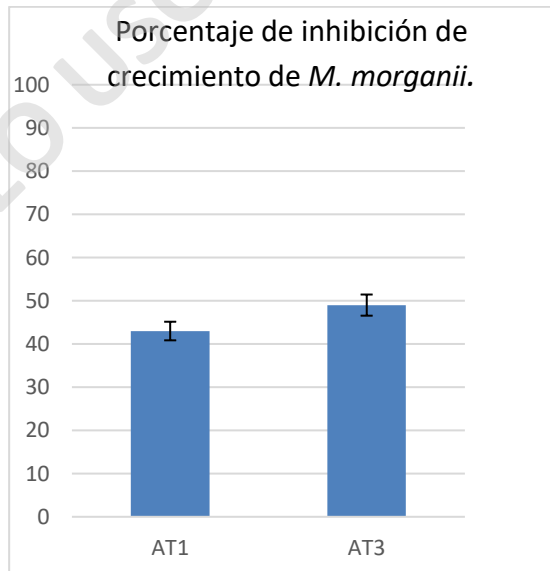
Gráfica 7: Inhibición de crecimiento de *P. alcaligenes*, tiempo 10 min.



Gráfica 8: Inhibición de crecimiento de *E. coli*, tiempo 60 min.



Gráfica 9: inhibición de crecimiento de *S. marcescens*, tiempo 20 min.



Gráfica 10: Inhibición de crecimiento de *M. morganii*, tiempo 30 min.

7.4 Comparación del apósito en base a sales de cobre con apósitos de plata

Una vez seleccionado el apósito con sal de cobre que presentó las mejores propiedades (AT1), se realizó un ensayo con el total de las 40 cepas bacterianas en triplicado, por medio del cual se comparó su actividad antimicrobiana con dos apósitos de plata comerciales, usados regularmente en el tratamiento de heridas correspondientes a un apósito de plata nanocrystalina (ACTICOAT™ FLEX 3) y apósito de sales de plata (Tegaderm® Ag Mesh de 3M).

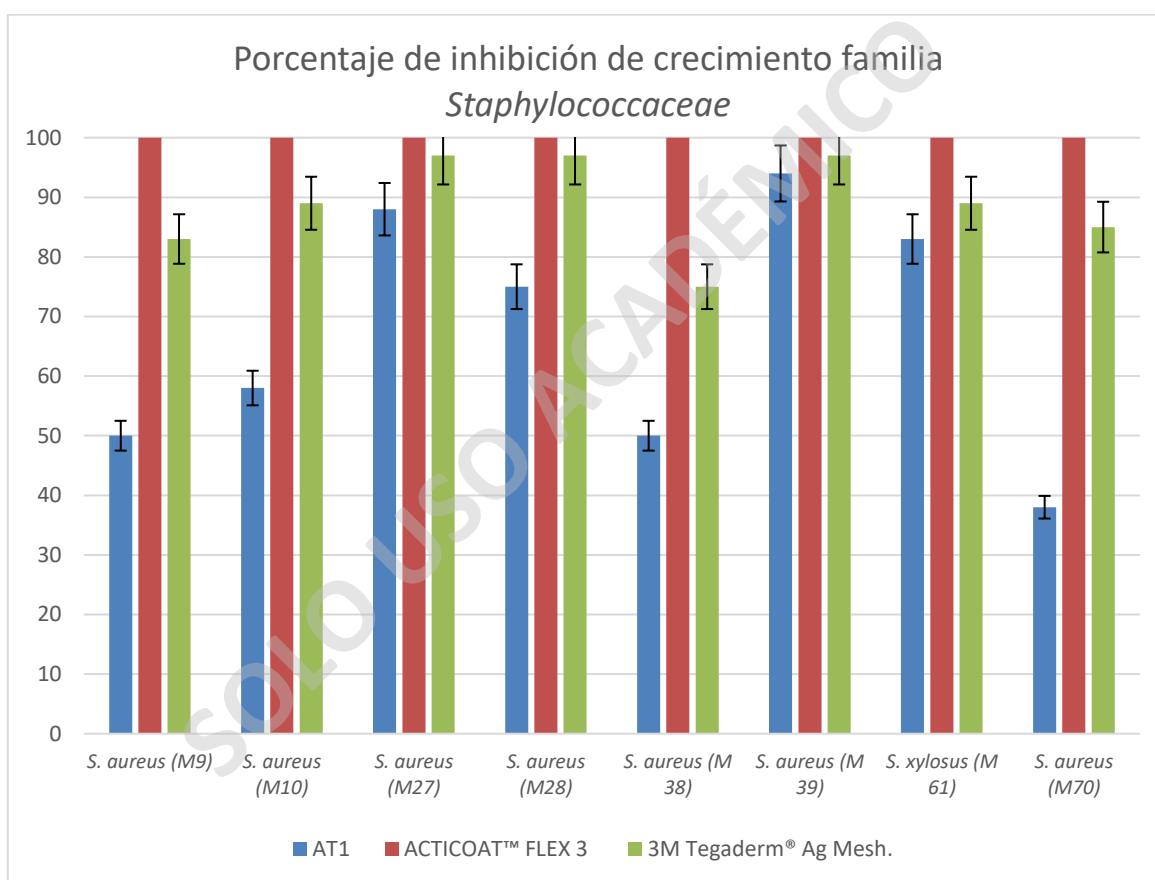
En la gráfica 11 que representa a la familia *Staphylococcaceae* se observa un porcentaje de inhibición promedio de 67% para el apósito AT1, 89% correspondiente a 3M Tegaderm® Ag Mesh y 100% para ACTICOAT™ FLEX 3, al calcular el valor P se obtuvo que entre Acetato de cobre por inmersión y apósito de plata Acticoat Flex 3 existía significancia estadística $P < 0,05$, no así con apósito de plata Tegaderm de 3M.

Con respecto a la familia *Enterococcaceae* representada en la gráfica 12 se observó una inhibición promedio significativa para apósitos de plata equivalentes a 65% 3M Tegaderm® Ag Mesh, alcanzando un 100% ACTICOAT™ FLEX 3 y con muy bajos rendimiento para AT1, alcanzando solo un 23%, al calcular el valor P se obtuvo que entre Acetato de cobre por inmersión y los dos apósitos de plata Acticoat Flex 3 y Tegaderm de 3M existía significancia estadística $P < 0,05$.

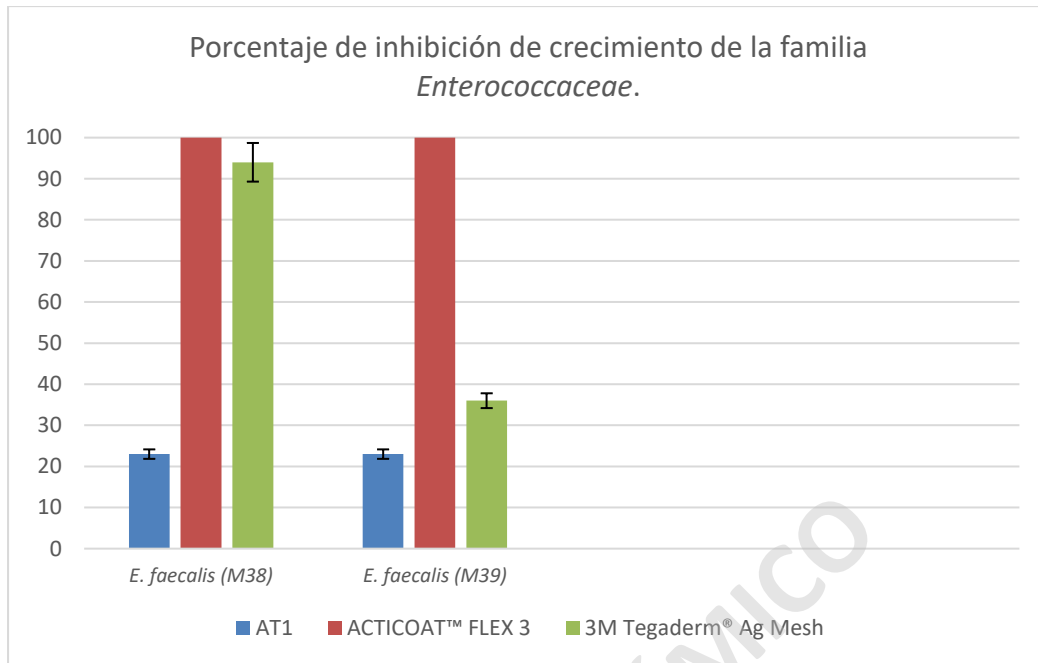
Tanto la familia *Streptococcaceae* como *Enterobacteriaceae* presenta una inhibición promedio de 100% para ambos apósitos de plata y un 65% de actividad para el apósito con sal de cobre, representados en la gráfica 13 y 14. Al calcular el valor P se obtuvo que entre Acetato de cobre por inmersión y los dos apósitos de plata Acticoat Flex 3 y Tegaderm de 3M existía significancia estadística $P < 0,05$ para *S. uberis*, no así con *S. agalactiae*. **Al calcular el valor P en especies de la familia *Enterobacteriaceae* se obtuvo que entre Acetato de cobre por inmersión y los dos apósitos de plata Acticoat Flex 3 y Tegaderm de 3M existía significancia estadística $P < 0,05$ para *P. rettgeri* (M17C2), *E. cloacae* (M21C2), *M. morgani* (M55C1) y *E. coli* (M64C3).** Los valores obtenidos a través de la gráfica 15 que representa a los BNF equivalen a un 100% de inhibición para ambos

apósitos con sales de plata y sólo un 45% para AT1. Al calcular el valor P se obtuvo que entre Acetato de cobre por inmersión y los dos apósitos de plata Acticoat Flex 3 y Tegaderm de 3M existía significancia estadística $P < 0,05$ para *P. aeruginosa* (M8), (M65C3), (M66C1) (M67C1).

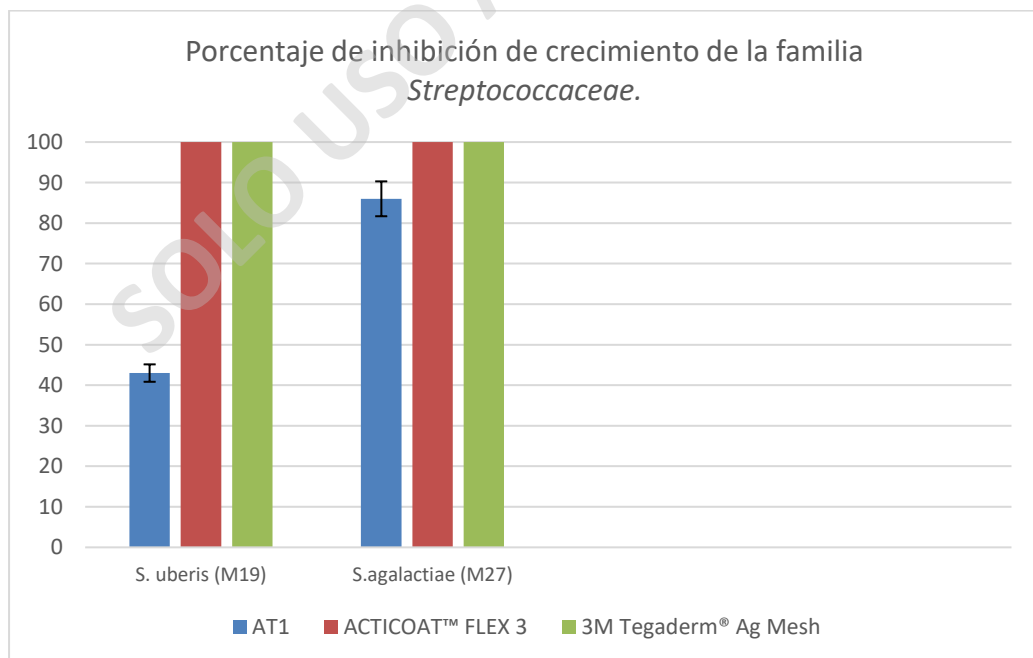
Se observó un patrón de inhibición global equivalente al 50% para el apósito con la sal de cobre en estudio. Todos los resultados fueron obtenidos en base al cuadrante control que poseía la misma dimensión que los apósitos.



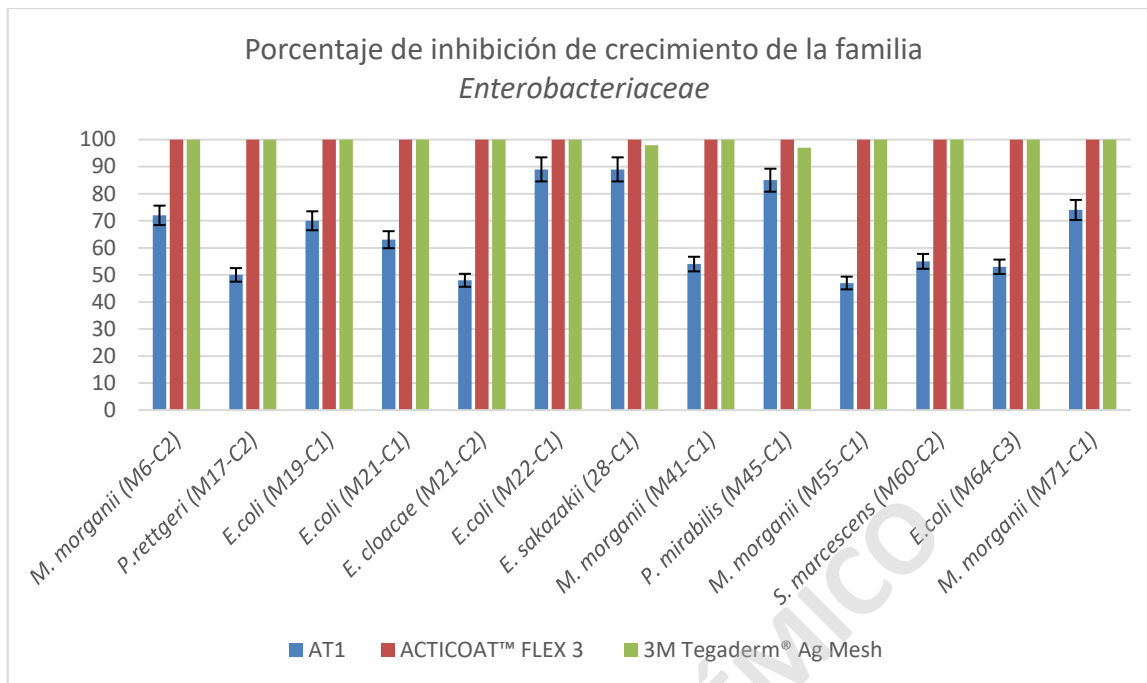
Gráfica 11: Inhibición de crecimiento de la familia *Staphylococcaceae* expuesta a apósito de acetato de cobre por inmersión y dos sales de plata.



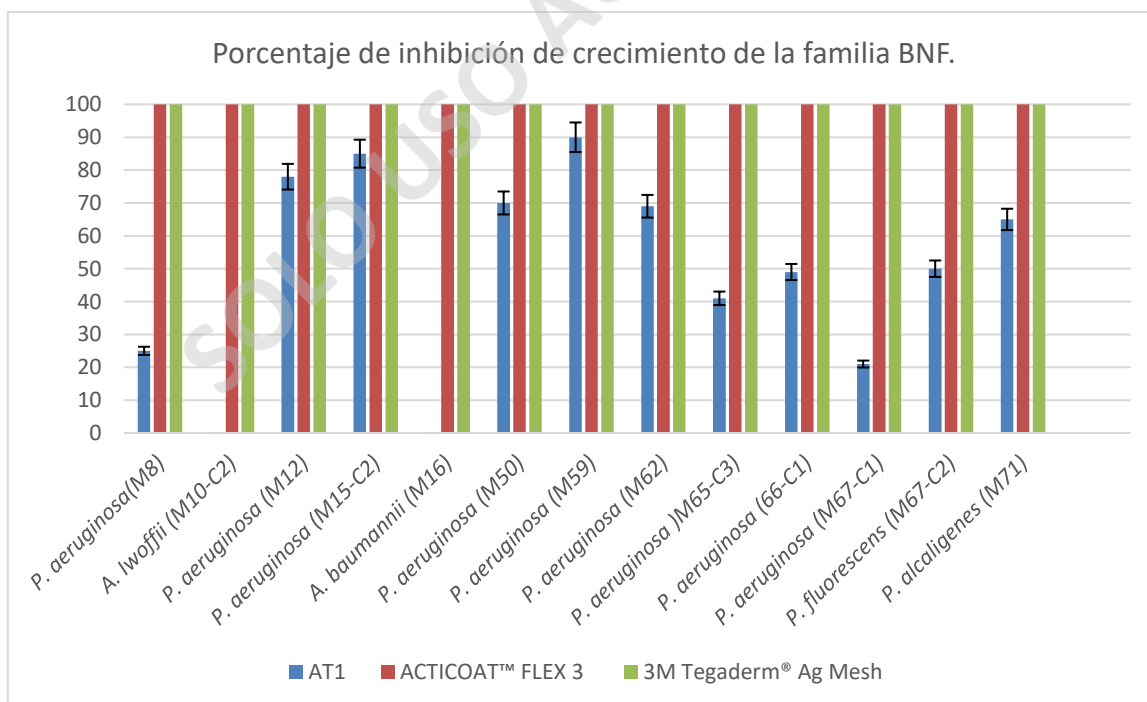
Gráfica 12: Inhibición de crecimiento de la familia *Enterococcaceae* expuesta a apósito de acetato de cobre por inmersión y dos sales de plata.



Gráfica 13: Inhibición de crecimiento de la familia *Streptococcaceae* expuesta a apósito de acetato de cobre por inmersión y dos sales de plata.



Gráfica 14: inhibición de crecimiento de la familia *Enterobacteriaceae* expuesta a apósito de acetato de cobre por inmersión y dos sales de plata.



Gráfica 15: inhibición de crecimiento de BNF expuesta a apósito de acetato de cobre por inmersión y dos sales de plata.

8.- DISCUSIÓN

La piel y los tejidos blandos constituyen la principal barrera estructural de defensa del organismo [1,2]. Toda lesión traumática que daña la composición estructural y funcional del tejido es considerada como herida. Éstas se clasifican en dos categorías, heridas agudas y crónicas, las cuales se diferencian por su gravedad y tiempo que tardan en remitir. Las heridas crónicas por definición son heridas que no pueden seguir un proceso de cicatrización ordenado, esto podría llegar a durar meses si no es tratado adecuadamente, agravando el estado de la herida y pudiendo llegar a perder la zona afectada [6,7].

En Latinoamérica la prevalencia de heridas crónicas y úlceras oscila en aproximadamente un 1% de la población general, entre úlceras abiertas y cicatrizadas, correspondiendo un 25% a úlceras venosas activas. En Chile, existen escasos datos con respecto a la prevalencia de este tipo de heridas. Las estadísticas disponibles muestran que aproximadamente 160.000 pacientes poseen algún tipo de herida o úlcera, constituyéndose el manejo de este tipo de pacientes en un problema de salud pública nacional [10]. A nivel país, el manejo de heridas crónicas está dirigido principalmente a las úlceras venosas, pie diabético, úlceras hipertensivas y úlceras por presión [11].

Los casos leves de infección generalmente pueden ser manejados con curaciones, reposo y antibióticos. En las infecciones moderadas y severas se debe hospitalizar, administrar antibiótico intravenoso y realizar tratamiento quirúrgico precoz, drenando abscesos, retirando el tejido desvitalizado y eventualmente amputando cuando esté indicado [27, 28, 29].

En un estudio previo, el tipo de herida crónica que presentó mayor grado de resistencia a los antibióticos correspondió a úlceras venosas, que representan entre el 75 al 80% del total de las úlceras vasculares [14]. Seguida de úlceras de pie que afecta entre un 15% a 25% de todos los individuos con diabetes, siendo la primera causa de hospitalización asociada a dicha patología y precediendo hasta un 85% de las amputaciones en este grupo de pacientes [13]. Los microorganismos que presentaron mayor resistencia fueron Gram negativos, dentro de éstos las enterobacterias, con respecto a las cocáceas Gram positivo

más prevalentes, se obtuvo que la familia *Staphylococcaceae* presentó mayor resistencia, lo cual coincide con publicaciones previas [30, 31].

Los apósitos han sido una herramienta en el tratamiento de heridas o úlceras cumpliendo un rol fundamental en su manejo. Al aplicarlos sobre una lesión permiten aislar, proteger y optimizar el proceso de cicatrización. Por el hecho de estar en contacto con la herida, se requiere que tengan una serie de cualidades de protección de la misma ante lesiones y ante la infección. El apósito correcto para el tratamiento de la herida depende no sólo del tipo de herida sino también de la etapa de cicatrización, si la adecuada elección de éste es capaz de brindar un ambiente óptimo necesario que preserve los principios fisiológicos básicos de humedad, calor, oxigenación y circulación sanguínea [3, 11, 18].

Estudios realizados por Michels y col. muestran que la acción antimicrobiana de las superficies de cobre se ejerce con la misma eficacia a diferentes temperaturas (35°C y 22°C) y en diferentes condiciones de humedad relativa del aire (entre rangos de 90% y 20%). Otros metales como la plata, que también son antimicrobianos, solamente son activos en ambientes de temperatura elevada (35°C) y alta humedad (90%) [34]. El cobre ha demostrado tener actividad bactericida frente a un amplio rango de patógenos incluyendo virus, bacterias y hongos. Investigadores han observado inhibición del crecimiento bacteriano de superficies de cobre frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans* [32, 35]. El cobre, a diferencia de otros materiales posee propiedades microbicidas por lo que pueden ofrecer protección antibacteriana de largo plazo. Estudios en curso en hospitales de Chile y Estados Unidos están poniendo en práctica el uso de diversos implementos de cobre en un estudio controlado para verificar la frecuencia de las infecciones intrahospitalaria comparando los resultados con los provenientes de otras instalaciones en donde el cobre no se emplea aún con este fin [32, 33].

Bajo la necesidad de crear nuevas alternativas de apósitos que logren presentar actividad antimicrobiana de amplio espectro, apoyen la cicatrización de heridas y disminuyan niveles de toxicidad se realizó el presente estudio con el fin de determinar la

actividad antimicrobiana *in vitro* de apósitos en base a sales de cobre sobre bacterias prevalentes asociadas a infecciones de heridas crónicas de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Heridas.

En este estudio se evidenció *in vitro* el efecto antimicrobiano del cobre frente a especies de diferentes familias bacterianas involucradas en infección de heridas crónicas. Los cuatro apósitos en estudio que poseían dos tipos de sales de cobre, acetato y nitrato de cobre incorporadas mediante técnicas de inmersión e impregnación presentaron actividad antimicrobiana, siendo más eficiente frente a *P. aeruginosa* (88%) y menos eficiente y *M. morganii* (43%) respectivamente, concordando con los datos previos publicados por otros autores [32-35]. Acetato de cobre por inmersión y por impregnación (AT1 y AT3) presenta mayor actividad porcentual que el nitrato de cobre, sin ser esta diferencia significativa ($P > 0,05$), evidenciando que ambas sales de cobre son efectivas *in vitro* para controlar a las bacterias analizadas.

En relación al aspecto del apósito de poliéster-rayón con la sal de cobre incorporada por estos dos métodos, se pudo evidenciar que la técnica de inmersión aplicada en AT1, mantuvo la tonalidad de la matriz de forma más homogénea, en cambio la técnica de impregnado manchó esta matriz por lo cual se seleccionó por sobre AT3 al presentar mejores propiedades (AT1). Este punto tiene relevancia debido a que dentro de los criterios para seleccionar un apósito se encuentra que el apósito no debe teñir la lesión y en este estudio AT3 correspondiente a acetato de cobre por impregnado, a pesar de poseer excelente actividad antimicrobiana, ponía en riesgo este factor fundamental debido a que en los ensayos era capaz de manchar la placa con el color que presentaba dicho apósito.

Al comparar su actividad antimicrobiana con dos apósitos de plata comerciales, usados regularmente en el tratamiento de heridas correspondientes a un apósito de plata nanocrystalina (ACTICOAT™ FLEX 3) y apósito de sales de plata (Tegaderm® Ag Mesh de 3M) se observó que frente a la familia *Staphylococcaceae* presentó un porcentaje de inhibición promedio de 67% para el apósito AT1, 89% correspondiente a 3M Tegaderm® Ag Mesh y 100% para ACTICOAT™ FLEX 3, lo que confirma datos que indican que la plata en su formulación nanocrystalina es más eficiente que sales de plata [36, 37]. Se determinó

además que existe significancia estadística con el apósito de plata nanocrystalina, no así con Tegaderm® Ag Mesh. Con respecto a la familia *Enterococcaceae* se observó una inhibición promedio por AT1 de un 23%, 65% 3M Tegaderm® Ag Mesh y 100% ACTICOAT™ FLEX 3, existiendo una significancia estadística entre ellos. Tanto la familia *Streptococcaceae* como *Enterobacteriaceae* presenta una inhibición promedio de un 65% de actividad para el apósito con sal de cobre y 100% para ambos apósitos de plata, existiendo una significancia estadística entre alguna de las especies y los apósitos de plata. Los BNF presentaron un 45% de inhibición por AT1 y 100% de inhibición por ambos apósitos con sales de plata, con significancia estadística entre los apósitos particularmente para la especie *P. aeruginosa*. Se observó actividad antimicrobiana frente a todas las especies con patrones de multirresistencia antimicrobiana presentes en infecciones de heridas crónicas utilizados en este estudio, siendo más efectivos para familia *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae* lo cual es de suma importancia al ser estas familias las de mayor prevalencia en infecciones de heridas crónicas [38,39].

Debido a los antecedentes anteriormente expuestos, la propiedad antimicrobiana del cobre abre posibilidades de nuevas alternativas en el desarrollo de apósitos para su aplicación en salud. La evidencia *in vitro* de su efecto antimicrobiano frente a estos patógenos entrega un importante aporte que podría ser utilizado en el tratamiento y/o manejo de pacientes que padezcan este tipo de patología en nuestro país.

En contraste a los apósitos en base a plata, el riesgo de reacciones adversas de la piel debido a la exposición cutánea al cobre es extremadamente baja [21]. Además se suma su acción en numerosos procesos fisiológicos y metabólicos en el funcionamiento apropiado de los tejidos del cuerpo humano que lo hacen ser una excelente alternativa para el manejo de pacientes que padezcan de heridas crónicas infectadas debido a que este oligoelemento está involucrado en la síntesis y estabilización de proteínas de la piel de la matriz extracelular y en la angiogénesis, por lo cual su uso aportaría en el bienestar de la piel al mejorar la cicatrización de heridas [40,41].

9.- CONCLUSIONES

- Las distintas sales de cobre incorporadas al apósito de poliéster-rayón presentan amplia actividad antimicrobiana.
- Acetato de cobre incorporado por inmersión o impregnación en la matriz de poliéster-rayón, mostraron mejor actividad antimicrobiana contra las distintas familias de agentes causantes de infección de úlcera crónica, en comparación a nitrato de cobre.
- En relación al aspecto del apósito de poliéster-rayón con la sal de cobre incorporada por estos dos métodos, se pudo evidenciar que la técnica de inmersión aplicada en AT1, mantuvo la tonalidad de la matriz de forma más homogénea por lo cual se seleccionó al presentar mejores propiedades.
- Los apósitos comerciales de plata, tanto de nanocristalina como de sales de plata, presentan *in vitro* mayor actividad antimicrobiana que el apósito de poliéster-rayón con acetato de cobre por inmersión.
- El apósito de acetato de cobre por inmersión sería una buena alternativa para el estudio futuro en el manejo de heridas crónicas infectadas.

10- ANEXOS

Anexo 1. Tabla de diagrama de valoración de Heridas.

DIAGRAMA DE VALORACIÓN DE HERIDAS				
Aspecto	1	2	3	4
	Eritematoso	Enrojecido	Amarillo pálido	Necrótico
Mayor extensión	0 - 1 cm	> 1-3 cm	> 3-6 cm	> 6 cm
Profundidad	0	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
Exudado cantidad	Ausente	Escaso	Moderado	Abundante
Exudado Calidad	Sin exudado	Seroso	Turbio	Purulento
Tejido esfacelado o necrótico	Ausente	< 25%	25-50%	>50%
Tejido granulatorio	100-75%	< 75-50%	< 50-25%	< 25%
Edema	Ausente	+	++	+++
Dolor	0 – 1	2 - 3	4 - 6	7-10
Piel circundante	Sana	Descamada	Eritematosa	Macerada

Anexo 2. Cepas seleccionadas para segunda fase del proyecto FONDEF

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	Ciprofloxacino	Cefoxitina	Cotrimoxazol	SAM	Tetraciclina
<i>Staphylococcaceae</i>	M9	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S
	M10	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S
	M27	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S
	M28	<i>Staphylococcus aureus</i>	I	S	S	I	S
	M38	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S
	M39	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S
	M61	<i>Staphylococcus xylosus</i>	S	S	R	R	S
	M70	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S	S

	Muestras	Identificación por Especie	Gentamicina	Vancomicina	Ampicilina	Ciprofloxacino
<i>Enterococcaceae</i>	M38	<i>Enterococcus faecalis</i>	R	S	S	R
	M39	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	I

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	Clindamicina	Eritromicina	Penicilina
<i>Streptococcaceae</i>	M19	<i>Streptococcus uberis</i>	R	R	R
	M27	<i>Streptococcus agalactiae</i>	R	R	R

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	Ciprofloxacino	Cefalotina	Cefuroximo	Ceftazidima	Gentamicina	Amikacina
Enterobacteriaceae	M6-C2	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S	S
	M17-C2	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R	R	R	S
	M19-C1	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	S
	M21-C1	<i>E.coli</i>	S	I	I	S	R	S
	M21-C2	<i>Enterobacter cloacae</i>	S	R	I	S	S	S
	M22-C1	<i>E.coli</i>	S	R	I	S	S	S
	M28-C1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	S	R	I	S	S	S
	M41-C1	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S	S
	M45-C1	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	S	S	R	R
	M55-C1	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	S	S	S
	M60-C2	<i>Serratia marcescens</i>	S	R	R	S	S	S
	M64-C3	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	S	S
	M71-C1	<i>Morganella morganii</i>	S	R	R	I	S	S

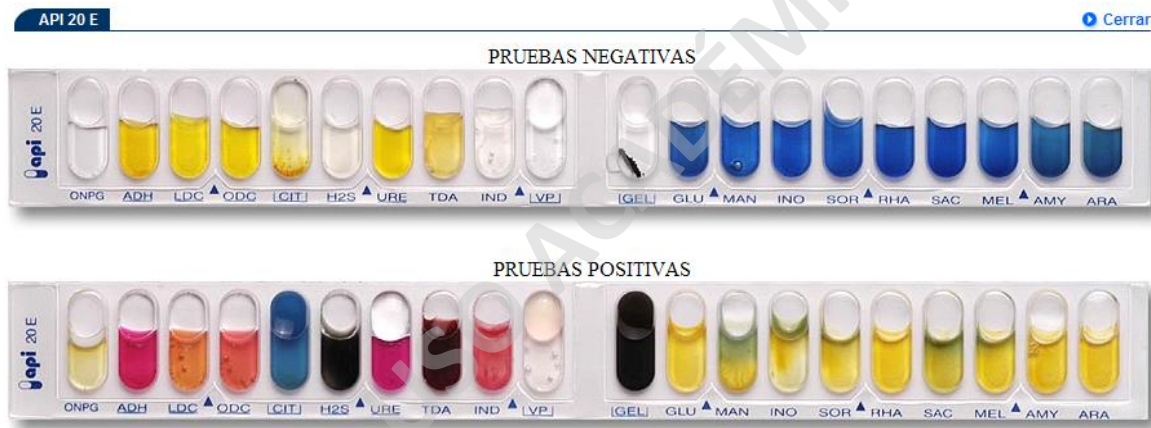
Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	Ciprofloxacino	Ceftazidima	Imipenem	Amikacina	Gentamicina	Ampicilina Sulbactam
BNF	M2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	S	S	S	S
	M7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	S	S	/
	M8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	S	/
	M10-C2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	R	R	S	S	S	S
	M12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	S	S	/
	M15-C2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	S	S	/
	M16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	S	I	R	S
	M50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	I	S	/
	M59	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	S	/
	M62	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	S	S	/
	M65-C3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	/
	M66-C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	S	/
	M67-C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	I	S	S	/
	M67-C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	R	R	S	S	/
M71	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	R	R	S	S	S	/	

Anexo 3. Lectura e interpretación de resultados de galería API® (Biomérieux®)

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el período de incubación, reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

La interpretación de los resultados, se basa en la observación de las coloraciones generadas en los microtubos y se comparan mediante la utilización de una carta de colores. De acuerdo a la interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).

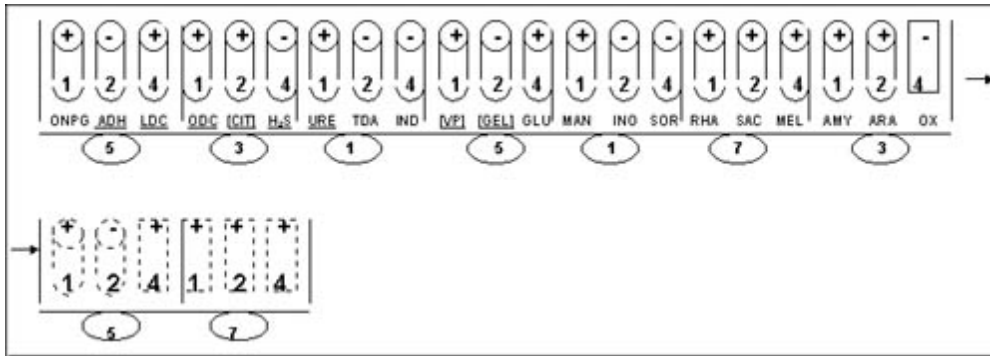
Las cartas de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas:



A manera de ejemplo se señalan los resultados obtenidos con un sistema miniaturizado API® 20E.

API® 20E

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las Enterobacterias y de otros bacilos Gram negativo.



Después del período de incubación y comparación con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo, se anotan en la hoja de resultados que suministra el fabricante. Los datos obtenidos se transforman en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla.

El código obtenido corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica.

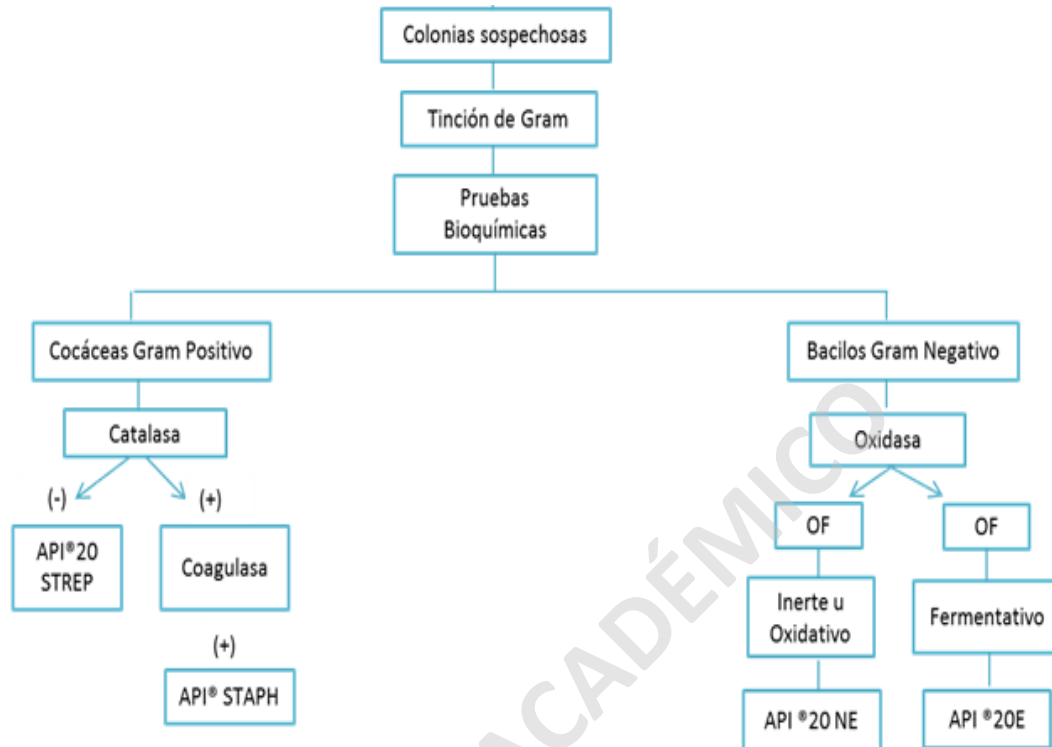
En este ejemplo el código **5315173** corresponde a la especie: *Enterobacter gergoviae*.

EXCELENTE IDENTIFICACION	
Galería	API 20 E V4.0
Perfil	5 3 1 5 1 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Enterobacter gergoviae</i>	99.9	0.95				

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.1	0.11	URE 1%	INO 99%	SOR 99%	

Anexo 4. Identificación bacteriana



Anexo 5. Protocolos de incorporación de la sal de cobre.

Procedimiento de técnica de absorción por inmersión

- Se prepararon soluciones de nitrato de cobre trihidratado (PM=241,6 g/mol) y acetato de cobre monohidratado (PM=199,7 g/mol) en una concentración de 2 g/Lt de agua destilada.
- En cada una de las soluciones se sumergieron los apósitos por un periodo de tiempo de 1 hora a temperatura ambiente con agitación moderada.
- Posteriormente se retiran los apósitos y se dejan secar a temperatura ambiente.

Procedimiento de técnica de impregnación

- Preparar soluciones de nitrato de cobre trihidrato y acetato de cobre monohidrato en concentración de 2 g/Lt de agua destilada a temperatura ambiente.
- Sumergir los apósitos en las soluciones preparadas durante 1 hora.
- Eliminar el exceso de agua.
- Sumergir los apósitos absorbidos durante 10 minutos en una solución al 0,1M de NaBH₄.

- Lavar o enjuagar los apósitos con agua desionizada.
- Secar a temperatura ambiente.

Anexo 6. Tabla de Contingencia y Prueba Chi-Cuadrado.

Para evaluar si existe relación entre dos factores (variables) se debe obtener primero la información de las frecuencias observadas a partir de una tabla de contingencia de tamaño $I \times J$, donde x_i corresponde a la categoría i del factor X e y_j corresponde a la categoría j del factor Y , siendo esta tabla de la siguiente manera:

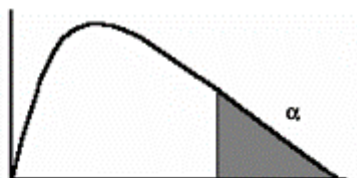
		Factor Y				
		y_1	y_2	...	y_j	
Factor X	x_1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1j}	$n_{1.}$
	x_2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2j}	$n_{2.}$
	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots	\vdots
	x_i	n_{i1}	n_{i2}	...	n_{ij}	$n_{i.}$
		$n_{.1}$	$n_{.2}$...	$n_{.j}$	n

Luego se debe calcular el valor estadístico Chi-cuadrado, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\chi_{obs}^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{\left(n_{ij} - \frac{n_{i.} \cdot n_{.j}}{n} \right)^2}{\frac{n_{i.} \cdot n_{.j}}{n}}$$

Luego de obtener este valor, se logra finalmente contrastar la hipótesis nula (H_0 : las variables son independientes) versus una hipótesis alternativa (H_1 : las variables están relacionadas) siendo H_0 rechazada cuando el valor de significancia asintótica es menor al nivel de significancia α establecido ($\alpha = 0,05$) o, de otro modo, cuando $\chi_{obs}^2 \geq \chi_{(I-1)(J-1); \alpha}^2$. (Tabla de distribución χ^2)

Tabla de Distribución χ^2



Grados de libertad	$\alpha=.995$	$\alpha=.99$	$\alpha=.975$	$\alpha=.95$	$\alpha=.90$	$\alpha=.10$	$\alpha=.05$	$\alpha=.025$	$\alpha=.01$	$\alpha=.005$
1	0.0000	0.0002	0.0010	0.0039	0.0158	2.7055	3.8415	5.0239	6.6349	7.8794
2	0.0100	0.0201	0.0506	0.1026	0.2107	4.6052	5.9915	7.3778	9.2103	10.597
3	0.0717	0.1148	0.2158	0.3518	0.5844	6.2514	7.8147	9.3484	11.345	12.838
4	0.2070	0.2971	0.4844	0.7107	1.0636	7.7794	9.4877	11.143	13.277	14.860
5	0.4117	0.5543	0.8312	1.1455	1.6103	9.2364	11.070	12.833	15.086	16.750
6	0.6757	0.8721	1.2373	1.6354	2.2041	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	0.9893	1.2390	1.6899	2.1673	2.8331	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.3444	1.6465	2.1797	2.7326	3.4895	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.7349	2.0879	2.7004	3.3251	4.1682	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.1559	2.5582	3.2470	3.9403	4.8652	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188

Anexo 6: Tabla N°2 Recuento para selección de apósito con mejor actividad antimicrobiana

Especie/Apósito	X=AT1/C.C		X=AT2/C.C		X=AT3/C.C		X=AT4/C.C	
<i>E. coli</i> (M64C3)	11	28	9	23	11	22	7	26
<i>S. aureus</i> (M70)	13	78	14	80	10	55	11	73
<i>M. morgani</i> (M41C1)	30	58	42	60	27	64	32	48
<i>P. alcaligenes</i> (M71C2)	2	20	4	18	2	16	4	17
<i>P. aeruginosa</i> (M65C3)	2	22	2	19	2	12	3	16

	Técnica/ tipo de apósito <i>E. coli</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	11 9,91 (0,12)	25 26,09 (0,05)	36
NiCu por inmersión	9 9,36 (0,01)	25 24,64 (0,01)	34
AcCu por impregnación	11 9,91 (0,12)	25 26,09 (0,05)	36
NiCu por impregnación	7 8,81 (0,37)	25 23,19 (0,14)	32
	38	100	138

$$\chi^2 = 0,862, df = 3, \chi^2 / gl = 0,29, \quad P(\chi^2 > 0,862) = 0,8345$$

El valor de chi- cuadrado es de 0,862. El valor de p es 0,8345, no existe relación significativa, $p > 0,05$

	Técnica/ tipo de apósito <i>S. aureus</i>		
	Apósito	C. control	
AcCu por inmersión	13 12.14 (0.06)	72 72.86 (0.01)	85
NiCu por inmersión	14 12.29 (0.24)	72 73.71 (0.04)	86
AcCu por impregnación	10 11.71 (0.25)	72 70.29 (0.04)	82
NiCu por impregnación	11 11.86 (0.06)	72 71.14 (0.01)	83
	48	288	336

$$\chi^2 = 0.715, df = 3, \chi^2/df = 0.24, \quad P(\chi^2 > 0.715) = 0.8698$$

El valor de chi- cuadrado es de 0,715. El valor de p es 0,8698, no existe relación significativa, $p > 0,05$

	Técnica/ tipo de apósito <i>M. morganii</i>		
	Apósito	C. control	
AcCu por inmersión	30 31.76 (0.10)	58 56.24 (0.05)	88
NiCu por inmersión	42 36.09 (0.97)	58 63.91 (0.55)	100
AcCu por impregnación	27 30.67 (0.44)	58 54.33 (0.25)	85
NiCu por impregnación	32 32.48 (0.01)	58 57.52 (0.00)	90
	131	232	363

$\chi^2 = 2.367$, $df = 3$, $\chi^2/df = 0.79$, $P(\chi^2 > 2.367) = 0.4997$

El valor de chi- cuadrado es de 2.367. El valor de p es 0, 4997, no existe relación significativa, $p > 0,05$.

	Técnica / tipo de apósito <i>P. alcaligenes</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	2 2,86 (0,26)	18 17,14 (0,04)	20
NiCu por inmersión	4 3,14 (0,23)	18 18,86 (0,04)	22
AcCu por impregnación	2 2,86 (0,26)	18 17,14 (0,04)	20
NiCu por impregnación	4 3,14 (0,23)	18 18,86 (0,04)	22
	12	72	84

$\chi^2 = 1,145$, $df = 3$, $\chi^2 / gl = 0,38$, $P(\chi^2 > 1,145) = 0,7661$

El valor de chi- cuadrado es de 1, 145. El valor de p es 0, 7661, no existe relación significativa, $p > 0,05$.

	Técnica / tipo de apósito P. aeruginosa		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	2 2,22 (0,02)	17 16,78 (0,00)	19
NiCu por inmersión	2 2,22 (0,02)	17 16,78 (0,00)	19
AcCu por impregnación	2 2,22 (0,02)	17 16,78 (0,00)	19
NiCu por impregnación	3 2,34 (0,19)	17 17,66 (0,02)	20
	9	68	77

$$\chi^2 = 0,287, \quad df = 3, \quad \chi^2 / gl = 0,10, \quad P(\chi^2 > 0,287) = 0,9624$$

El valor de chi- cuadrado es de 0, 287. El valor de p es 0,9624, no existe relación significativa, $p > 0,05$.

Anexo 7: tabla N° 3 Tiempos diferidos

Especie/Apósito	X=AT1/ C.C		X=AT3/ C.C	
S. aureus (M9) 90 min.	13	78	10	55
P. alcaligenes (M71C2) 10 min	2	20	3	16
E. coli (M22) 60 min	3	18	4	16
M. morgani (M41C1) 30 mi	30	58	27	64
S. marcescens (M60C2) 20 min	5	62	6	71

	Efectividad/tiempo <i>S.aureus</i> (90 min)		
	Apósito	C. control	
AcCu por inmersión	13 11.72 (0.14)	67 68.28 (0.02)	80
AcCu por impregnación	10 11.28 (0.15)	67 65.72 (0.02)	77
	23	134	157

$$\chi^2 = 0.334, \quad df = 1, \quad \chi^2/df = 0.33, \quad P(\chi^2 > 0.334) = 0.5633$$

El valor de chi-cuadrado es de 0,3341. El valor de p es 0.563254. Este resultado es *no* significativo, con $p > 0,05$.

	Efectividad / Tiempo <i>P. alcaligenes</i> (10 min)		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	2 2,44 (0,08)	18 17,56 (0,01)	20
AcCu por impregnación	3 2,56 (0,08)	18 18,44 (0,01)	21
	5	36	41

$$\chi^2 = 0,176, \quad df = 1, \quad \chi^2 / gl = 0,18, \quad P(\chi^2 > 0,176) = 0,6751$$

El valor de chi-cuadrado es de 0,1757. El valor p es 0.675082. Este resultado es *no* significativo con $p > 0,05$.

	Efectividad / Tiempo de <i>E. coli</i> (60 min)		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	3 3,41 (0,05)	17 16,59 (0,01)	20
AcCu por impregnación	4 3,59 (0,05)	17 17,41 (0,01)	21
	7	34	41

$$\chi^2 = 0,119, \quad df = 1, \quad \chi^2 / gl = 0,12, \quad P(\chi^2 > 0,119) = 0,7307$$

El valor de chi-cuadrado es de 0,1185. El valor p es 0.730626. Este resultado es *no* significativo con $p > 0,05$.

	Efectividad/tiempo <i>M. morganii</i> (30 min)		
	Apósito	C. control	
AcCu por inmersión	30 28.98 (0.04)	61 62.02 (0.02)	91
AcCu por impregnación	27 28.02 (0.04)	61 59.98 (0.02)	88
	57	122	179

$$\chi^2 = 0.108, \quad df = 1, \quad \chi^2/df = 0.11, \quad P(\chi^2 > 0.108) = 0.7429$$

El valor de chi-cuadrado es de 0,1076. El valor de p es 0.742841. Este resultado es *no* significativo con $p > 0,05$

	Efectividad / Tipo de apósito <i>S. marcescens</i> (20 min)		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	5 5,46 (0,04)	67 66.54 (0.00)	72
AcCu por impregnación	6 5,54 (0,04)	67 67.46 (0.00)	73
	11	134	145

$$\chi^2 = 0,084, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 0,08, \quad P (\chi^2 > 0,084) = 0,7720$$

El valor de chi-cuadrado es 0.084. El valor de p es 0.771926. Este resultado es *no* significativo con $p > 0,05$.

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	AT1 P1	FLEX 3 P1	3M P1	Cuadrante control	
<i>Staphylococcaceae</i>	M9	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	0	1	15	
			3	0	5	10	
			5	0	1	12	
			x=6	x=0	x=2	x=12	
				I:50%	I:100%	I:83%	
	M10	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	0	2	35	
			4	0	2	12	
			7	0	1	9	
			x=8	x=0	x=2	x=19	
				I:58%	I:100%	I:89%	
	M27	<i>Staphylococcus aureus</i>	11	0	5	140	
			21	0	3	120	
			16	0	4	130	
			x=16	x=0	x=4	x=130	
				I:88%	I:100%	I:97%	
	M28	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	0	2	59	
			5	0	0	37	
			5	0	1	32	
			x=5	x=0	x=1	x=32	
				I:75%	I:100%	I:97%	
	M38	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	6	
			4	0	2	10	
			1	0	1	5	
			x=2	x=0	x=1	x=4	
				I:50%	I:100%	I:75%	
	M39	<i>Staphylococcus aureus</i>	48	0	25	73	
			35	0	22	85	
			42	0	24	79	
x=42			x=0	x=24	x=79		
			I:94%	I:100%	I:97%		
M61	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	0	2	23		
		5	0	5	13		
		2	0	2	18		
		x=3	x=0	x=2	x=18		
			I:83%	I:100%	I:89%		
M70	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	1	21		
		9	0	2	9		
		9	0	2	8		
		x=8	x=0	x=2	x=13		
			I:38%	I:100%	I:85%		

	Efectividad / tipo de apósito Familia <i>Staphylococcaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu Inmersión	11 6,20 (3,73)	38 42,80 (0,54)	49
Plata (Flex 3)	0 4,80 (4,80)	38 33,20 (0,70)	38
	11	76	87

$$\chi^2 = 9,765, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 9,77, \quad P(\chi^2 > 9,765) = 0,0018$$

El valor de chi-cuadrado es de 9,7653. El valor p es 0.001778. Este resultado es significativo $p < 0,05$

	Efectividad / tipo de apósito Familia <i>Staphylococcaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
inmersión AcCu	11 8,52 (0,72)	38 40,48 (0,15)	49
Plata (3M)	5 7,48 (0,82)	38 35,52 (0,17)	43
	dieciséis	76	92

$$\chi^2 = 1,867, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 1,87, \quad P(\chi^2 > 1,867) = 0,1719$$

El valor de chi-cuadrado es de 1,8666. El valor p es 0.171861. Este resultado es no significativo $p > 0,05$.

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	AT1	FLEX 3	3M	Cuadrante control
			P1	P1	P1	
<i>Enterococcaceae</i>	M38	<i>Enterococcus faecalis</i>	5	0	0	17
			13	0	0	11
			13	0	2	20
			x=10	x=0	x=1	x=16
			l:23%	l: 100%	l:94%	
M39	<i>Enterococcus faecalis</i>	57	0	12	56	
		23	0	25	48	
		40	0	19	52	
		x=40	x=0	x=19	x=52	
		l: 23%	l: 100%	l:36%		

	Efectividad / tipo de apósito Familia <i>Enterococcaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	25 15,86 (5,27)	34 43,14 (1,94)	59
Plata (Flex 3)	0 9,14 (9,14)	34 24,86 (3,36)	34
	25	68	93

$\chi^2 = 19,703$, $df = 1$, $\chi^2 / gl = 19,70$, $P (\chi^2 > 19.703) = 0,00009$

El valor de chi-cuadrado es 19.7034. El valor p es 0.000009. Este resultado es significativo, $p < 0,05$.

	Efectividad / tipo de apósito Familia <i>Enterococcaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	25 20,05 (1,22)	34 38,95 (0,63)	59
Plata (3M)	10 14,95 (1,64)	34 29,05 (0,84)	44
	35	68	103

$\chi^2 = 4,336$, $df = 1$, $\chi^2 / gl = 4,34$, $P (\chi^2 > 4.336) = 0,0373$

El valor de chi-cuadrado es de 4.4461. el valor de p es de 0.037313. Este resultado es significativo, $p < 0.05$.

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	AT1	FLEX 3	3M	Cuadrante control
			P1	P1	P1	
Streptococcaceae	M19	<i>Streptococcus uberis</i>	37	0	0	68
			25	0	0	40
			31	0	0	54
			x= 31	x=0	x=0	x=54
			l:43%	l:100%	l:100%	
	M27	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	0	26
			8	0	0	43
			6	0	0	37
			x=5	x=0	x=0	x=35
			l: 86%	l:100%	l:100%	

	Efectividad / tipo de apósito		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	18 10,50 (5,36)	45 52,50 (1,07)	63
Plata (Flex 3)	0 7,50 (7,50)	45 37,50 (1,50)	45
	18	90	108

$\chi^2 = 15,429$, $df = 1$, $\chi^2 / gl = 15,43$, $P (\chi^2 > 15.429) = 0,0001$

El valor de chi-cuadrado es 15.4286. El valor de p es 0.000086. Este resultado es significativo con $p < 0,05$.

	Efectividad / tipo de apósito		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	18 10,50 (5,36)	45 52,50 (1,07)	63
Plata (3M)	0 7,50 (7,50)	45 37,50 (1,50)	45
	18	90	108

$\chi^2 = 15,429$, $df = 1$, $\chi^2 / gl = 15,43$, $P (\chi^2 > 15.429) = 0,0001$.

El valor de chi-cuadrado es 15.4286. El valor de p es 0.000086. Este resultado es significativo con $p < 0,05$.

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	AT1	FLEX 3	3M	Cuadrante control
			P1	P1	P1	
Enterobacteriaceae	M6-C2	<i>Morganella morganii</i>	16	0	0	35
			15	0	0	36
			3	0	0	46
			X= 11	x=0	x=0	x=39
			I: 72%	I: 100%	I: 100%	
	M17-C2	<i>P.rettgeri</i>	2	0	0	12
			8	0	0	22
			12	0	0	27
			x= 10	x=0	x=0	x= 20
			I: 50%	I: 100%	I: 100%	
	M19-C1	<i>E.coli</i>	7	0	0	48
			13	0	0	40
			22	0	0	51
			x= 14	x=0	x=0	x= 46
			I: 70%	I: 100%	I: 100%	
	M21-C1	<i>E.coli</i>	12	0	0	21
			9	0	0	38
			12	0	0	30
			x= 11	x=0	x=0	x=30
			I: 63%	I: 100%	I: 100%	
	M21-C2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	15
			21	0	0	19
			13	0	0	35
			x=12	x=0	x=0	x=23
			I: 48%	I: 100%	I: 100%	
	M22-C1	<i>E.coli</i>	7	0	0	58
			8	0	0	87
			10	0	0	75
			x=8	x=0	x=0	x=73
			I: 89%	I: 100%	I: 100%	
	M28-C1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	5	0	1	31
			5	0	0	59
			6	0	0	46
			x=5	x=0	x=1	x=45
			I: 89%	I: 100%	I: 98%	
	M41-C1	<i>Morganella morganii</i>	38	0	0	87
			46	0	0	135
			83	0	0	146
			x= 56	x=0	x=0	x= 123
			I: 54%	I: 100%	I: 100%	
	M45-C1	<i>Proteus mirabilis</i>	3	0	0	27
			3	0	0	46
			10	0	2	29
			x=5	x=0	x=1	x= 34
			I: 85%	I: 100%	I: 97%	
	M55-C1	<i>Morganella morganii</i>	29	0	0	41
			16	0	0	44
24			0	0		
x=23			x=0	x=0	x=43	
I: 47%			I: 100%	I: 100%		
M60-C2	<i>Serratia marcescens</i>	3	0	0	7	
		5	0	0	14	
		8	0	0	13	
		x=5	x=0	x=0	x=11	
		I: 55%	I: 100%	I: 100%		
M64-C3	<i>E.coli</i>	5	0	0	16	
		3	0	0	12	
		13	0	0	17	
		x=7	x=0	x=0	x=15	
		I: 53%	I: 100%	I: 100%		
M71-C1	<i>Morganella morganii</i>	8	0	0	48	
		14	0	0	50	
		18	0	0	51	
		X=13	x=0	x=0	x=50	
		I: 74%	I: 100%	I: 100%		

	Efectividad/tipo de apósito Familia <i>Enterobacteriaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	14 8,00 (4,50)	42 48,00 (0,75)	56
Plata (Flex 3)	0 6,00 (6,00)	42 36,00 (1,00)	42
	14	84	98

$$\chi^2 = 12.250, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 12.25, \quad P (\chi^2 > 12.250) = 0,0005$$

El valor de chi-cuadrado es de 12.25. El valor de p es de 0,000465. Este resultado es significativo, con $p < 0,05$.

	Efectividad/tipo de apósito Familia <i>Enterobacteriaceae</i>		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	14 8,00 (4,50)	42 48,00 (0,75)	56
Plata (3 M)	0 6,00 (6,00)	42 36,00 (1,00)	42
	14	84	98

$$\chi^2 = 12.250, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 12.25, \quad P (\chi^2 > 12.250) = 0,0005$$

El valor de chi-cuadrado es de 12.25. El valor de p es de 0,000465. Este resultado es significativo, con $p < 0,05$.

Grupo/Familia	Muestras	Identificación por Especie	AT1	FLEX 3	3M	Cuadrante control
			P1	P1	P1	
BNF	M2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	0	0	58
			33	0	0	65
			109	0	0	87
			x=54	x=0	x=0	x=70
			l: 23%	l:100%	l:100%	
	M7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	0	0	34
			36	0	0	38
			31	0	0	35
			x=30	x=0	x=0	x=36
			l: 17%	l:100%	l:100%	
	M8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	0	0	20
			14	0	0	28
			18	0	0	24
			x=18	x=0	x=0	x=24
			l:25%	l:100%	l:100%	
	M10-C2	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	75	0	0	49
			20	0	0	46
			50	0	0	49
			x=48	x=0	x=0	x=48
			l:0%	l:100%	l:100%	
	M12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	0	0	65
			23	0	0	133
			23	0	0	100
			x=22	x=0	x=0	x=99
			l: 78%	l:100%	l:100%	
	M15-C2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	88
			20	0	0	48
			11	0	0	69
			x=10	x=0	x=0	x=68
			l: 85%	l:100%	l:100%	
	M16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	27	0	0	39
			27	0	0	28
			62	0	0	17
			x=39	x=0	x=0	x=28
			l:0%	l:100%	l:100%	
	M50	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70	0	0	76
			66	0	0	68
			55	0	0	70
			x=64	x=0	x=0	x=71
			l:70%	l:100%	l:100%	
	M59	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0	0	36
			4	0	0	43
			5	0	0	41
			x=4	x=0	x=0	x=40
			l:90%	l:100%	l:100%	
	M62	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	0	0	33
			13	0	0	44
			12	0	0	40
			x=12	x=0	x=0	x=39
			l: 69%	l:100%	l:100%	
	M65-C3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	0	0	40
			24	0	0	40
			33	0	0	38
			x=23	x=0	x=0	x=39
			l: 41%	l:100%	l:100%	
	M66-C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	0	0	22
			21	0	0	34
			14	0	0	43
			x=20	x=0	x=0	x=33
			l:49%	l:100%	l:100%	
	M67-C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	0	0	37
			26	0	0	30
			28	0	0	35
			x=27	x=0	x=0	x=34
			l: 21%	l:100%	l:100%	
	M67-C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	81	0	0	122
			36	0	0	116
			60	0	0	121
			x=59	x=0	x=0	x=119
			l: 50%	l:100%	l:100%	
	M71	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	11	0	0	33
			13	0	0	35
			13	0	0	34
			x=12	x=0	x=0	x=34
			l:65%	l:100%	l:100%	

	Efectividad/tipo de apósito Familia BNF		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	29 17.66 (7.28)	52 63.34 (2.03)	81
Plata (Flex 3)	0 11.34 (11.34)	52 40.66 (3.16)	52
	29	104	133

$$\chi^2 = 23,809, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 23.81, \quad P(\chi^2 > 23.809) = 0,00001$$

El valor de chi- cuadrado es de 23.8086. El valor p es 0,000001. Este resultado es significativo, con $p < 0,05$.

	Efectividad/tipo de apósito Familia BNF		
	Apósito	C. Control	
AcCu por inmersión	29 17.66 (7.28)	52 63.34 (2.03)	81
Plata (3M)	0 11.34 (11.34)	52 40.66 (3.16)	52
	29	104	133

$$\chi^2 = 23,809, \quad df = 1, \chi^2 / gl = 23.81, \quad P(\chi^2 > 23.809) = 0,00001$$

El valor de chi- cuadrado es de 23.8086. El valor p es 0,000001. Este resultado es significativo, con $p < 0,05$.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva VE, Alburquenque C, Ramírez C, Silva V, Sánchez M (2011) Microbiología Clínica y Diagnóstico de laboratorio. Santiago de Chile
2. Lozano JS, Sebastián MS, González F, Matos THS, Gómez MLN (2011) Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. Protoc. diagnóstico-terapéuticos la AEP Infectología pediátricas. pp 159–175
3. Jiménez CE (2008) Curación avanzada de heridas. Colomb 23:146–155
4. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J Int Med Res 37:1528–1542
5. Ogunshe AAO, Niemogha MT, Azum GN, Odikagbue AN (2012) Wounds, Microbiological evaluation of antibiotic resistance in bacterial flora from skin. J. Pharm. Biomed. Sci. 22:
6. Andrades DP, Sepúlveda S, GONZÁLEZ J (2004) Curación avanzada de heridas. Rev Chil Cirugía 56:396–403
7. Stroncek JD, Reichert WM (2008) Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. Indwelling Neural Implant. Strateg. Contend. with Vivo Environ.
8. M.J.Callam, C.Vruckley, D.R.Harper, J.J.Dale Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. Br. Med. JOURNA 290.
9. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW (2005) A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. J Antimicrob Chemother. doi: 0.1093/jac/dkh513
10. González RC, Robles CC, Gómez FC, et al (2011) Manual de prevención y cuidados locales de Heridas Crónicas, Primera Ed.
11. Aburto I, Morgado P (2010) Gestión en manejo avanzado de heridas y úlceras en Chile. Rev Chil Heridas Ostomias 1:3–13
12. Ki V, Rotstein C (2008) Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 19:
13. Valenzuela S (2010) Infecciones en el pie diabético: Consideraciones microbiológicas y terapéuticas. Rev Chil Heridas Ostomias 1:22–30

14. Aparicio T, Flores D. Determinación de la prevalencia de especies bacterianas y perfil de sensibilidad en infecciones de heridas crónicas: Universidad Mayor;2014.
15. Moues CM, Heule F, Legerstee R, Hovius SE: Five millennia of wound care products what is new? A literature review. *Ostomy Wound Manage.* 2009;55(3):16–18, 20, 22.
16. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L (2006) Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings
17. Møller KK, Zulkowski K, James G (2011) Chronic Wound Colonization, Infection, and Biofilms. *Biofilm Infect.* pp 350– 359
18. Aburto I, Morgado P, et al (2000) Manejo y tratamiento de las heridas y úlceras: Apósitos y coberturas.
19. <http://www6.uc.cl/manejoheridas/html/aposito.html>
20. Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, et al. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(5):H1821–7.
21. Gorter RW, Butorac M, Cobian EP. Examination of the cutaneous absorption of copper after the use of copper-containing ointments. *Am J Ther* 2004;11: 453–8.
22. Furukawa Electric Develops Lighter Auto Wiring Harness for 2010-2012 Cars. *Japan Metal New.* 10 October, 2007. Disponible en:
http://www.japanmetalbulletin.com/top_bn/nm071010.html
23. AMIRA international Ltd. Copper Technology Roadmap Summary. Melbourne, Australia: AMIRA International Ltd, 2004 disponible en:
<http://www.amira.com.au/documents/copperrm/public.htm>
24. Bittencourt, Sergio, De Keulenaer, Hans, and McDermott, Mike. SEE Roadmap. New York, NY: International Copper Association, Ltd., 2004
25. Borkow G, Gabbay J. Copper as a biocidal tool. *Curr Med Chem* 2005;12: 2163–75.
26. Borkow G. Using copper to fight microorganisms. *Curr Chem Biol* 2012; 6: 93-103.
27. Schast VB (2010) Pie diabético: Introducción a su manejo. *Rev Chil Heridas Ostomias* 1:14–22

28. O.Nelezen, D.Bergqvist, A.Lindhagen, T.Hallbook (2005) Chronic leg ulcers: an underestimated problem in primary health care among elderly patients. *J Epidemiol Community Health* 55:143–149
29. Bowler PG (2012) Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. 419–427
30. Citron DM, Goldstein EJC, Merriam CV, Lipsky BA, Abramson MA (2007) Bacteriology of Moderate-to-Severe Diabetic Foot Infections and *In Vitro* Activity of Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol.* 45.
31. Young L (2012) Identifying infection in chronic wounds. *Wound Pract. Res.* 20.
32. Mehtar S., Wiid I., Todorov S.V. 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. *Journal of Hospital Infection*, 2008, 68:45-51.
33. Zambrano A, Herrera N. 2004. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Leonardo Guzmán de Antofagasta, Chile. *Rev Chil Infect*; 21 (2): 117-124.
34. Michels HT, Noyce JO and Keevil CW. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49:191-195.
35. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect* 2006; 63: 289-97.
36. Thomas S, McCubbin P. An in vitro analysis of the antimicrobial properties of 10 silver-containing dressings. *J Wound Care* 2003; 12(8): 305-8.
37. Ip M, Lui SL, Poon VKM, et al. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* 2006; 55: 59-63.
38. B. Q. Gastón Cartagena P. (2010) Biopelículas y Heridas desde la teoría hasta la práctica clínica. *Rev Chil Heridas Ostomias* 1:47–56
39. Lichtenfels E, Frankini AD, Paludo J, D’Azevedo PA (2008) Prevalência de resistência bacteriana nas infecções de ferida operatória em cirurgia arterial periférica. *Resist Bact em Cir Vasc* 7:239–247

40. McLafferty E, Hendry C, Alistair F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. Nurs. Stand. 2012; 27: 35-42.
41. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur. J Dermatol. 2002; 12: 390-9.

SOLO USO ACADÉMICO

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA ENTREGA DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Yo, **Victor E. Silva V** (Rut: 10.293.845-3), dejo constancia de la aprobación del trabajo de investigación titulado **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE APÓSITOS EN BASE A SALES DE COBRE SOBRE PATOGENOS ASOCIADOS A INFECCIONES DE HERIDAS CRÓNICAS”**, realizado por la alumna María Carolina Ugalde Silva, para enviar a su revisión el día 02/12/16. Ante esto, autorizo su envío revisión.



Firma

Santiago, 27 de enero de 2017