

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DE  
TRES CONCENTRACIONES DE GAS OZONO CONTRA  
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas  
aeruginosa*.**

**FEDERICO ESTEBAN FUENTES LUCERO**

**Médico Veterinario**

**GUATEMALA, AGOSTO DE 2018**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DE TRES  
CONCENTRACIONES DE GAS OZONO CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa*.**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD**

**POR**

**FEDERICO ESTEBAN FUENTES LUCERO**

Al conferírsele el título profesional de

**Médico Veterinario**

En el grado de Licenciado

**GUATEMALA, AGOSTO DE 2018**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
JUNTA DIRECTIVA**

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| DECANO:     | M.A. Gustavo Enrique Taracena Gil.       |
| SECRETARIO: | Dr. Hugo René Pérez Noriega              |
| VOCAL I:    | M. Sc. Juan José Prem González.          |
| VOCAL II:   | Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel |
| VOCAL III:  | Lic. Zoot. Alex Rafael Salazar Melgar    |
| VOCAL IV:   | Br. Jazmín Adalí Sian Gamboa             |
| VOCAL V:    | Br. María Fernanda Amézquita Estévez     |

**ASESORES**

**M.V. OTTO LEONIDAS LIMA LUCERO**

**M.A. DORA ELENA CHANG CHANG DE JO**

## **HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DE TRES  
CONCENTRACIONES DE GAS OZONO CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa*”**

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

**MÉDICO VETERINARIO**

### **ACTO QUE DEDICO A:**

- A mis padres:** Por su amor incondicional, por ser profesionales ejemplares a los cuales siempre admiré, por su altruismo humanitario y por ser todo lo que un hijo necesita de sus padres.
- A mi prometida:** Por ser mi fuente de inspiración y no perder nunca la fe en mí.
- A mis amigos:** Por su apoyo y afecto a lo largo de los años.

## **AGRADECIMIENTOS**

|                            |                                                      |
|----------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>A mis asesores:</b>     | Por ser guías comprometidos y dedicados              |
| <b>A Otto Lima:</b>        | Por ser el primer veterinario al que admiré          |
| <b>A Vilma Cruz:</b>       | Por ver lo bueno en mí y por su confianza y apoyo    |
| <b>A Karina Gutiérrez:</b> | Por incluirme y enseñarme tanto sobre medicina       |
| <b>A David Morán:</b>      | Por su excelencia profesional y su amistad           |
| <b>A Daniel Lara:</b>      | Por inspirarme siempre a leer y mejorar cada día     |
| <b>A Beatriz de Viau:</b>  | Por sus consejos y ejemplaridad humana y profesional |

## ÍNDICE

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUCCIÓN. ....                                          | 1  |
| II. HIPÓTESIS. ....                                            | 2  |
| III. OBJETIVOS. ....                                           | 3  |
| 3.1 Objetivo General. ....                                     | 3  |
| 3.2 Objetivos específicos. ....                                | 3  |
| IV. REVISIÓN DE LITERATURA. ....                               | 4  |
| 4.1 Resistencia bacteriana a antibióticos. ....                | 4  |
| 4.1.1 Tipos de resistencia. ....                               | 4  |
| 4.2 Ozono. ....                                                | 6  |
| 4.2.1 Propiedades del ozono. ....                              | 6  |
| 4.2.2 Propiedades físico-químicas del ozono. ....              | 7  |
| 4.2.3 Carácter oxidante del ozono. ....                        | 8  |
| 4.2.4 Métodos de obtención de Ozono. ....                      | 8  |
| 4.2.5 Propiedades germicidas del ozono. ....                   | 8  |
| 4.2.6 Consideraciones sobre las concentraciones de ozono. .... | 9  |
| 4.2.7 Descubrimiento y estudios sobre ozonoterapia. ....       | 10 |
| 4.2.8 Ozonoterapia en medicina veterinaria. ....               | 12 |
| 4.3 Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio. ....      | 13 |
| 4.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> . ....                      | 13 |
| 4.3.1.1 Características de cultivo. ....                       | 13 |
| 4.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....                     | 14 |
| 4.3.2.1 Características de cultivo y bioquímicas. ....         | 15 |
| 4.3.2.2 Resistencia bacteriana. ....                           | 15 |
| 4.4 Cultivo de bacterias. ....                                 | 16 |
| 4.4.1 Medio de cultivo. ....                                   | 16 |
| 4.4.2 Medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion). ....        | 16 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS. ....                                  | 17 |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 5.1 Área de trabajo: .....                              | 17 |
| 5.2 Recursos Humanos: .....                             | 17 |
| 5.3 Recursos Biológicos: .....                          | 17 |
| 5.4 Materiales y equipo: .....                          | 17 |
| 5.4.1 Materiales de oficina. ....                       | 17 |
| 5.4.2 Materiales y equipo de laboratorio. ....          | 18 |
| 5.5 Criterios de inclusión.....                         | 18 |
| 5.5.1 Selección de cepas.....                           | 18 |
| 5.5.2 Selección de concentraciones de ozono. ....       | 19 |
| 5.6 Método.....                                         | 19 |
| 5.6.1 Resiembra de cepas.....                           | 19 |
| 5.6.2.1 Exposición de las bacterias a gas ozono. ....   | 20 |
| 5.6.2.2 Recopilación de resultados por repetición. .... | 21 |
| 5.7 Análisis estadístico.....                           | 21 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                        | 22 |
| 6.1 Determinación del efecto bactericida. ....          | 22 |
| VII. CONCLUSIONES .....                                 | 27 |
| VIII. RECOMENDACIONES.....                              | 28 |
| IX. RESUMEN.....                                        | 29 |
| SUMMARY.....                                            | 30 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....                     | 31 |

## ÍNDICE DE CUADROS

### **Cuadro 1.**

Efecto bactericida del ozono contra *Staphylococcus aureus*.....25

### **Cuadro 2.**

Efecto bactericida del ozono contra *Pseudomonas aeruginosa*.....25

### **Cuadro 3.**

Abreviaturas y acrónimos.....35

### **Cuadro 4.**

Hoja de recopilación de datos por repetición.....35

### **Cuadro 5.**

Crecimiento de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar BHI.....37

### **Cuadro 6.**

Crecimiento de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar BHI.....37

## ÍNDICE DE FIGURAS.

### **Figura 1.**

Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de tres concentraciones de ozono contra *Staphylococcus aureus*.....36

### **Figura 2.**

Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de tres concentraciones de ozono contra *Pseudomonas aeruginosa*.....36

## **I. INTRODUCCIÓN.**

El aumento de la resistencia bacteriana a antibióticos es un problema que amenaza la salud animal y por extensión, la humana. El uso inadecuado de antibióticos para tratar infecciones bacterianas sin recurrir primero a antibiogramas y otros criterios de selección terapéutica, aumentan la resistencia bacteriana, dificultando el tratamiento de infecciones por la disminución de la efectividad de las opciones terapéuticas disponibles.

La ozonoterapia consiste en el uso del gas Ozono (O<sub>3</sub>) efectivo en el tratamiento de diversas enfermedades. Dado que las bacterias se disipan en una atmósfera rica en oxígeno, las enfermedades causadas por estos agentes son tratadas en medicina humana con ozono. La ozonoterapia tiene efectos beneficiosos comprobados en pacientes humanos como una mejor recuperación de enfermedades degenerativas o ulcerativas complicadas con infecciones bacterianas (pie diabético), efectos antioxidantes, inmunomoduladores, antiálgicos, antiinflamatorios y germicidas.

Entre los potenciales beneficios de su uso, se encuentran el empleo de una terapia natural sin efectos secundarios adversos, evita un período de retiro de subproductos de origen animal (leche, carne, huevos) y una alternativa terapéutica que no favorece la resistencia bacteriana. En Guatemala, el uso de Ozono es limitado en medicina humana y no existen estudios que validen su uso en medicina veterinaria. Se deben realizar investigaciones básicas y clínicas que demuestren la validez y utilidad de estas terapias para incluirlas dentro de la medicina ortodoxa cuando así se requiera. Este estudio fue realizado con el fin de generar información que respalde la ozonoterapia como alternativa terapéutica de enfermedades bacterianas en medicina veterinaria.

## **II. HIPÓTESIS.**

Ho: No existe efecto bactericida *in vitro* de ninguna de las tres concentraciones de gas ozono a evaluar, sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a utilizar en la fase experimental.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivo General.**

- Generar información sobre el efecto bactericida *in vitro* del ozono que valide la ozonoterapia como alternativa terapéutica contra enfermedades bacterianas en medicina veterinaria.

#### **3.2 Objetivos específicos.**

- Determinar la actividad bactericida *in vitro* de tres concentraciones de gas ozono contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Comparar la efectividad bactericida *in vitro* entre las tres concentraciones de gas ozono contra cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **4.1 Resistencia bacteriana a antibióticos.**

La resistencia bacteriana es el mecanismo mediante el cual la bacteria disminuye la efectividad de los agentes antimicrobianos; es causada por el uso excesivo e inadecuado de antibióticos. En años recientes la producción y desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable, surgiendo un problema de consecuencias impredecibles. La rapidez con que surgen los microorganismos multirresistentes es mayor a la velocidad con que se dispone de nuevos antibióticos por lo que pronto no habrá agentes efectivos para tratar a pacientes con sepsis graves (Cars et al., 2008).

La resistencia bacteriana es un problema de importancia actual a nivel global. El aumento de la resistencia bacteriana puede llegar a impedir prácticas como la cirugía mayor, trasplantes de órganos y la quimioterapia, ya que sin medicamentos efectivos en el control y prevención de infecciones bacterianas, aumentaría el riesgo de infección para los pacientes. El Centro de Control de Enfermedades de Europa, en su primer reporte epidemiológico sobre enfermedades en Europa establece que la más importante amenaza por enfermedades es de microorganismos que se han vuelto resistentes a antibióticos (Cars et al., 2008).

#### **4.1.1 Tipos de resistencia.**

La resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida. La resistencia natural o intrínseca es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular. La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a

antimicrobianos de bacterias con resistencia ocurre a través de conjugación, transformación o transducción (Sierra, 2017).

El uso de agentes antimicrobianos también aumenta la presión selectiva para el surgimiento de cepas resistentes. *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son claros de esta situación. A lo largo de la historia, han mostrado adaptaciones a muchos de los antibióticos actualmente disponibles y se han identificado los genes responsables en cada adaptación (Sierra, 2017).

La resistencia adquirida es un cambio en la composición genética de la bacteria. Los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias son:

- Bombas de eflujo o excreción.
- Inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas.
- Bloqueo de la penetración mediante modificación del sitio activo.
- Modificación ribosomal.
- Disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana.
- Biofilmes y sobre-expresión del sitio blanco (Sierra, 2017).

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), a través de mecanismos como:

- Transformación: Transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias.

- *Transducción*: Transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago.
- *Transposición*: Movimiento de una sección de ADN (transposón) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos.
- *Conjugación*: Intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor) (Sierra, 2017).

## **4.2 Ozono.**

### **4.2.1 Propiedades del ozono.**

El ozono está presente en la atmósfera de modo natural. Es un gas azul tenue opaco que filtra las radiaciones solares de alta frecuencia y absorbe la mayoría de los rayos ultravioleta del sol, asegurando la vida en el planeta. Dado que ninguna bacteria anaerobia, virus, protozoos u hongo pueden vivir en una atmósfera con alta concentración de oxígeno, todas las enfermedades causadas por estos agentes patógenos son potencialmente curables mediante la acción del ozono. Usado correctamente, es una terapia económica y simple con efectividad en un amplio espectro de prácticas sanitarias y médicas (Ilzarbe, 2010).

El ozono está presente como un constituyente gaseoso natural en las capas altas de la atmósfera y representa el 0,0001% de su composición total. Etimológicamente, la palabra Ozono deriva del griego Ozein, verbo que significa "oler", y esto reafirma las características de este gas, el cual no puede olerse cuando su concentración supera las 0,1 ppm, porque comienza a ser un gas irritante. El descubrimiento de las propiedades bactericidas y cicatrizantes del ozono permitió a los investigadores profundizar en el conocimiento de sus efectos beneficiosos, hasta entonces desconocidos, y en el uso del ozono como terapia

curativa en los distintos campos de la medicina. Kleinmann, en Alemania, realizó el primer estudio bacteriológico en el que describió el efecto del ozono sobre organismos patógenos (Arencibia, Leyva, Collymore y Araujo, 2006).

#### **4.2.2 Propiedades físico-químicas del ozono.**

El ozono es una variedad alotrópica del elemento oxígeno que contiene un átomo más que el oxígeno atmosférico. Es inestable, se descompone de forma espontánea en oxígeno diatómico lo que hace muy difícil en la práctica su transporte y almacenamiento, por lo que es necesaria su obtención en el lugar y momento de su empleo. Es perceptible por su olor penetrante y color ligeramente azulado a elevadas concentraciones (Arencibia et al., 2006).

Su molécula está compuesta por tres átomos de oxígeno enlazados entre sí. El proceso de descomposición implica la formación de oxígeno molecular y ocurre con desprendimiento de energía. Su formación presupone la absorción de la misma cantidad de energía. El ozono es soluble en una gran cantidad de disolventes orgánicos, siendo baja su solubilidad en agua, pero 10 veces mayor que el oxígeno. El ozono presenta una banda intensa de absorción en la región ultravioleta del espectro, entre los 200-300 nm. Esta propiedad del ozono es la que permite el desarrollo de la vida en la Tierra, al absorber en la estratosfera la mayor parte de la luz ultravioleta proveniente del sol, acción que reduce la intensidad de esta radiación en unas 900 veces, tomando como referencia la concentración de ozono reportada para la capa de ozono (Arencibia et al., 2006, Ilzarbe, 2010; Menéndez, Gonzáles, Ledea, Hernández, León y Díaz, 2016).

#### **4.2.3 Carácter oxidante del ozono.**

Este gas reacciona con una gran cantidad de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, se destaca por su gran poder oxidante en disolución acuosa. Después se dan potenciales de oxidación-reducción de compuestos oxigenados de reconocido poder oxidante. La reactividad química del ozono y el oxígeno difieren marcadamente y aunque el segundo se combina con prácticamente todos los elementos lo hace solamente a elevadas temperaturas mientras el ozono lo hace en condiciones de reacción mucho más nobles (Arencibia et al., 2006; Menéndez et al., 2016).

#### **4.2.4 Métodos de obtención de Ozono.**

El ozono se genera con fines útiles a la sociedad en equipos llamados ozonizadores. Su aplicación implica su generación *in situ*. Los métodos para su obtención son la electrosíntesis por chispa o descarga silente, la irradiación con luz ultravioleta con longitud de onda menor a 200 nm y la electrólisis. Casi todos los generadores de ozono se basan en el método de descarga silente por barrera dieléctrica (Menéndez et al., 2016).

#### **4.2.5 Propiedades germicidas del ozono.**

Desde su descubrimiento, el ozono ha sido reconocido como una sustancia muy oxidante. Esta propiedad le confiere un elevado poder germicida, permitiendo su empleo en la desinfección de aguas (Arencibia et al., 2006; Ilzarbe, 2010).

En el campo de la medicina, en 1915, Wolf usó el ozono, teniendo en cuenta su carácter germicida, en el tratamiento local de fístulas, úlceras por decúbito, heridas infectadas, así como en la osteomielitis. Posteriormente, tras el

descubrimiento de los materiales plásticos, se hizo posible el tratamiento local de extremidades sépticas con ozono gaseoso, introduciéndose en bolsas plásticas de fácil producción y adquisición. Con el progresivo desarrollo de la ozonoterapia, se introdujo el tratamiento mediante sistemas de baja presión (subatmosférico) por Werkmeister en 1976. Esta variante permite, mediante dispositivos resistentes a la acción oxidante del ozono, el tratamiento local de lesiones sépticas. La acción germicida de amplio espectro del ozono permite que la ozonoterapia sea un valioso tratamiento para la limpieza y desinfección de heridas infectadas y otros procesos sépticos locales. Además, esta forma de aplicación puede ser combinada con otros procedimientos también derivados de las aplicaciones del gas sin el peligro de resistencia de los microorganismos, ni de toxicidad o efectos adversos y con la ventaja de resultados curativos más precoces en afecciones en las que la evolución puede ser de meses (Arencibia et al., 2006; Menéndez et al., 2016).

En los tratamientos locales se plantea la inactivación de los microorganismos por la acción directa del ozono, con la ruptura oxidativa posterior de sus membranas (Menéndez et al., 2016).

#### **4.2.6 Consideraciones sobre las concentraciones de ozono.**

Las concentraciones y dosis recomendadas en la ozonoterapia provienen de estudios *in vitro* e *in vivo*, por tanto, deben ser tomadas en cuenta como recomendaciones solamente y ser adaptadas a cada paciente en particular con sus condiciones específicas. Se sabe que existe un intervalo de concentraciones terapéuticas entre 25 a 80 mg/L. Estudios de microscopía electrónica realizados en eritrocitos, linfocitos, leucocitos y trombocitos sometidos a diferentes concentraciones de ozono refieren alteraciones en ellos a partir de 80 a 90 mg/L (Menéndez et al., 2016).

#### 4.2.7 Descubrimiento y estudios sobre ozonoterapia.

El ozono fue descubierto en 1840 por el químico alemán Christian Frederick Schönbein de la Universidad de Basilea en Suiza. En 1940, Kleinmann realizó los primeros ensayos bacteriológicos sobre gérmenes patógenos y la primera insuflación del gas en animales y humanos. Actualmente, la investigación científica en cuanto a usos médicos del ozono está siendo llevado a cabo en Cuba, Rusia y Alemania (Ilzarbe, 2010; Menéndez et al., 2016).

La naturaleza química del ozono fue dada a conocer en 1872 por Benajmin Collins Brodie y en 1873, Fox descubrió su capacidad para eliminar microorganismos. Frolich y Erlwein divulgaron el empleo del ozono para fines higiénicos (Menéndez et al., 2016).

Las primeras aplicaciones fueron el tratamiento de aguas, atendiendo su capacidad desinfectante. En medicina pasaron muchas décadas de silencio desde su descubrimiento hasta que, durante la Primera Guerra Mundial, el ozono fue utilizado para la curación de heridas y fístulas por Albert Wolff. El escaso y simple estudio de las bases biológicas de la ozonoterapia y la experiencia clínica se han mantenido limitadas a la práctica de la medicina privada (Menéndez et al., 2016).

En 1998 un estudio *in vitro* fue realizado en la Universidad médica y dental de Tokyo con el objetivo de comparar el efecto bactericida de ozono gaseoso con el de agua ozonizada para determinar su posible utilidad en la desinfección de dentaduras. Para el estudio se utilizaron cepas de *Streptococcus mutans* y *S. aureus* aisladas de casos clínicos de odontología. Al usar el gas, el número de bacterias de las dos cepas seleccionadas disminuyó a niveles no detectables por espectrofotometría después de 3 minutos de exposición de ozono a un flujo

constante de 20 mg/L. El estudio concluyó que la exposición a ozono gaseoso tiene un mejor efecto bactericida que el agua ozonizada. Cuando las bacterias fueron expuestas a ozono gaseoso, un efecto bactericida fue expresado y se volvió más evidente con el tiempo. En contraste, el agua ozonizada presentó efectividad bactericida durante los primeros 30 segundos, sin cambios posteriores. Estos resultados demostraron que el efecto germicida depende del número de moléculas de ozono en contacto con las bacterias. También se observó que el ozono, comparado con otros métodos de limpieza dental disponibles comercialmente, presentaba un mejor efecto germicida (Oizumi, Suzuki, Uchida, Furuya y Okamoto, 1998).

En otros estudios se reporta la disminución de la concentración inicial de los microorganismos desde los primeros instantes de la ozonización para microorganismos Gram positivos y negativos, esporas de *Bacillus subtilis* y *Cryptosporidium* (Fernandez, Bataller, Hernández, Sánchez y Morales, 2009).

En el 2009 se evaluó el efecto oxidante de ozono contra *Escherichia coli*, *Salmonella entericavar* y *Salmonella Typhimurium* y se logró determinar que la actividad antimicrobiana del ozono tiene un efecto residual debido a los subproductos de la reacción. Tras el agotamiento del ozono disuelto desde los primeros instantes, se detectó actividad antimicrobiana generada cuando no se detectaba ozono disuelto en el medio de exposición. Se observó una rápida disminución del número inicial de microorganismos debido a la acción del ozono bajo concentraciones superiores a 0.4mg/L. Se determinó que el diseño de los tratamientos pueden mejorarse teniendo en cuenta el mecanismo de acción y su relación con parámetros tales como el tiempo de contacto y la concentración de ozono disuelto en medios líquidos. Por ello se hace necesario profundizar en estudios dirigidos a evaluar los efectos de la ozonización bajo diferentes condiciones experimentales sobre microorganismos (Fernandez et al., 2009).

#### 4.2.8 Ozonoterapia en medicina veterinaria.

La ozonoterapia empezó a ser utilizada recientemente en clínica veterinaria con resultados que motivan a profesionales del área realizar trabajos científicos relacionados con esta opción terapéutica. Las enfermedades que padece el ser humano son similares a las que afectan a los animales. Al tomar como antecedentes los estudios realizados en modelos experimentales de laboratorio y en humanos, es posible fundamentar el uso de la ozonoterapia en diferentes enfermedades de animales que son difíciles de controlar con tratamientos convencionales (Vidal, 2009).

Estudios clínicos realizados con ozonoterapia en pacientes que padecían enfermedades como osteodistrofia y displasia coxofemoral, fractura múltiple de cadera, *Acanthosis nigricans*, lipidosis hepática, estrechamiento del espacio intervertebral L1-L2 y calificación del disco intervertebral T12-T13, tuvieron resolución completa de las enfermedades y lesiones, disminución y posterior eliminación del dolor y aumento de actividad e interacción con otras mascotas (Vidal, 2009).

Los estudios fueron realizados con concentraciones entre 0.1 a 100 mg/L de ozono con flujos de oxígeno que varían de 0.25 a 1 L/min. Las vías de administración empleadas para las distintas enfermedades fueron rectal, autohemoterapia menor (sangre ozonizada intramuscular) y paravertebral (Vidal, 2009).

Las enfermedades fueron tratadas previamente utilizando medicamentos alopáticos como antiinflamatorios, esteroides, protectores gástricos, antibióticos, baños de clorhexidina o peróxido de benzoilo, ketoconazol e itraconazol,

fluidoterapia y antieméticos. En ninguno de los pacientes se logró una resolución satisfactoria con estos medicamentos y en algunos casos los cuadros empeoraron por los efectos secundarios adversos. Estos ensayos clínicos y otros estudios *in vitro* sobre el efecto microbicida del ozono, respaldan el uso de la ozonoterapia como una terapia complementaria o alternativa para tratar patologías comunes en medicina veterinaria, tanto por los resultados como por la ausencia de efectos secundarios adversos (Vidal, 2009).

#### **4.3 Cepas bacterianas seleccionadas para el estudio.**

##### **4.3.1 *Staphylococcus aureus*.**

Los estafilococos son cocos esféricos, Gram positivos, generalmente dispuestos en forma irregular como racimos de uvas. Algunos forman parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas de los mamíferos y las aves. Otros están asociados a procesos supurativos, infecciones óseas, genitourinarias, de piel, tejidos blandos y oportunistas, septicemias e intoxicaciones alimentarias. Los estafilococos son el microorganismo más extendido que existe y su difusión en la naturaleza es extraordinaria. *Staphylococcus aureus* es la especie que más se ha estudiado (Stanchi, 2007).

##### **4.3.1.1 Características de cultivo.**

El género no presenta exigencias nutritivas. En medio líquido, después de 24 horas de incubación a 37°C, se desarrollan produciendo turbidez homogénea con abundante depósito en el fondo del tubo y a menudo aparece un crecimiento en forma de anillo en la superficie del medio que se adhiere a las paredes del tubo. En medios sólidos, forman colonias redondas de 1 a 2 milímetros de diámetro, de

contornos netos y superficie lisa, opaca y mucoide (Stanchi, 2007).

#### **4.3.1.2 Resistencia bacteriana.**

*Staphylococcus aureus* es el mejor ejemplo de la evolución adaptativa de las bacterias en la era de los antibióticos, ya que continuamente demostró una habilidad única para responder rápidamente a cada antibiótico nuevo al que se enfrentó, con el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia, empezando con la penicilina y metilcilina hasta otros más recientes como linezolid y daptomicina. Los mecanismos de resistencia incluyen la inactivación de antibióticos por enzimas, la alteración estructural bacteriana con afinidad disminuida por el antibiótico y bombas de eflujo (Okano, 2009).

Complejos mecanismos de resistencia bacteriana han sido adquiridas por *S. aureus* a través de mutaciones espontaneas y selección positiva. La detección de nuevos mecanismos de resistencia son un respaldo importante para la vigilancia de la susceptibilidad antibiótica en *S. aureus* y el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces (Okano, 2009).

#### **4.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*.**

El género *Pseudomonas* está integrado por numerosas especies, ampliamente distribuidas en la naturaleza, el suelo, el agua y en todo lugar donde exista materia orgánica en descomposición. *Pseudomonas aeruginosa* es la única que en el hombre y los animales reviste una enorme importancia clínica, aunque raramente constituye el agente primario de la enfermedad. El aislamiento en cultivo puro de *P. aeruginosa* es un fuerte indicio de patogenicidad, en especial en pacientes con tejidos debilitados por quemaduras o traumas, con heridas,

neoplasias, inmunosuprimidos o con antecedentes de tratamiento con antibióticos y corticoides, por la resistencia que presenta esta bacteria a numerosos antibióticos (Stanchi, 2007).

#### **4.3.2.1 Características de cultivo y bioquímicas.**

Es un bacilo aerobio estricto, utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque puede crecer en un ambiente anaeróbico empleando nitratos como aceptor terminal de electrones. No tiene exigencias nutritivas y crece en medios comunes de laboratorio. Se desarrolla entre los 10 y 42°C. Se desarrolla en 24 horas a pH 7 (Stanchi, 2007).

#### **4.3.2.2 Resistencia bacteriana.**

*Pseudomonasaeruginosa* es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos por la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión de varias bombas de eflujo y la producción de enzimas que inactivan antibióticos. También es capaz desarrollar o adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. Esto se debe a la gran versatilidad de su genoma además de su distribución en hábitats acuáticos que constituyen una reserva para bacterias que acarrean otros genes asociados con resistencia bacteriana. Las infecciones causadas por cepas resistentes son de interés en muchos hospitales alrededor del mundo ya que están asociados con aumentos en índices de mortalidad, bacteremias secundarias y tiempo de hospitalización, así como un aumento considerable en costos de salud (Mesaros et al., 2007).

#### **4.4 Cultivo de bacterias.**

Consiste en propagar bacterias brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Las bacterias adaptadas al hombre y a los animales tienen la capacidad de desarrollarse en medios nutritivos fuera del hospedador (*in vitro*) (Stanchi, 2007).

##### **4.4.1 Medio de cultivo.**

Es una mezcla equilibrada de componentes nutricionales que reúnen la condiciones para la multiplicación *in vitro* de los gérmenes que allí se siembran. Contiene una fuente de carbono, nitrógeno y azufre, una fuente mineral, y factores de crecimiento que la bacteria es incapaz de sintetizar como ciertos aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. Además durante el crecimiento se deben regular el pH, la temperatura, la concentración de sales y la potencia iónica (Stanchi, 2007).

##### **4.4.2 Medio de cultivo BHI (Brain Heart Infusion).**

Es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidas bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. El agar sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia a partir de muestras clínicas y no clínicas. El agar BHI obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de hidrocarburos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato di sódico como tampón en el medio (Becton, Dickinson and Company, 2013).

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1 Área de trabajo:**

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), USAC.

### **5.2 Recursos Humanos:**

- Estudiante tesista
- Personal de laboratorio

### **5.3 Recursos Biológicos:**

Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas y proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología FMVZ, USAC.

### **5.4 Materiales y equipo:**

#### **5.4.1 Materiales de oficina.**

- Cuaderno de notas.
- Computadora.
- Hojas papel bond
- Impresora
- Lapiceros

- Cámara fotográfica

#### **5.4.2 Materiales y equipo de laboratorio.**

- Tanque de oxígeno.
- Flujómetro.
- Mangueras de conducción.
- Sondas de alimentación.
- Asa bacteriológica de nicromo.
- Generador de ozono Doktor Ozono CVTOX.
- Guates de látex.
- Incinerador de asas
- Nefelómetro.
- Medio de cultivo BHI en placas de petri.
- Agua destilada.
- Campana bacteriológica de flujo laminar.
- Incubadora.

#### **5.5 Criterios de inclusión.**

##### **5.5.1 Selección de cepas.**

Cepas bacterianas con baja susceptibilidad a fármacos antimicrobianos: tanto *P. aeruginosa* como *S. aureus* son resistentes a una amplia gama de antibióticos, la resistencia es desarrollada naturalmente y potenciada por malas prácticas de uso.

Diferencias estructurales: Las bacterias Gram + (*S. aureus*) y Gram – (*P. aeruginosa*) presentan diferencias estructurales en su membrana celular que influyen en la efectividad de tratamientos conocidos y experimentales. Ambos grupos deben ser incluidos en experimentos sobre efectos bactericidas.

### **5.5.2 Selección de concentraciones de ozono.**

Las propiedades beneficiosas del ozono se obtienen aplicándolo a una concentración entre los 25 - 80 mg/L. La capacidad de obtener una concentración deseada de ozono depende del generador y el flujómetro del tanque de gas. Por estos motivos se seleccionaron concentraciones de 25, 35 y 50 mg/L que se encuentran dentro del rango terapéutico y se pueden obtener con el generador de ozono disponible.

## **5.6 Método.**

### **5.6.1 Resiembra de cepas.**

La resiembra de las bacterias se llevó a cabo según el protocolo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC. El medio de cultivo elegido para la siembra fue BHI. Ambas cepas bacterianas, conservadas en refrigeración en el banco de cepas, fueron sembradas por separado usando el método de siembra masiva en dos placas con agar sangre. Después de ser incubadas durante 24 horas a 37°C, no hubo contaminación con otro microorganismo y se procedió con la fase experimental.

## **5.6.2 Fase experimental.**

### **5.6.2.1 Exposición de las bacterias a gas ozono.**

Cada cepa bacteriana en estudio fue suspendida en agua destilada en tubos de ensayo usando el asa bacteriológica de nicromo. Se usó el asa hasta alcanzar una concentración de 0.5 medidas de turbidez nefelométricas ( $15 \times 10^7$  UFC/ml) en el agua destilada de cada tubo, siendo esta la concentración bacteriana estándar para siembra empleada en el Departamento de Microbiología de la FMVZ. Al agua destilada de cada tubo se le aplicó un flujo constante de gas ozono durante tres minutos. Estudios previos realizados con otras especies bacterianas y concentraciones bajas de ozono (0.4mg/L), concluyen que después de un minuto de exposición se elimina la mayoría de bacterias y después de tres minutos son totalmente eliminadas. La exposición a ozono se repitió cinco veces para cada concentración (25, 35 y 50 mg/L). Por cada vez que se usaron las tres concentraciones en distintos tubos, se realizó un control negativo que no fue expuesto a ozono. Se utilizaron en total veinte tubos por cada cepa, cinco tubos para cada concentración y cinco para los controles.

La ozonización del agua destilada se realizó con una sonda de alimentación estéril cuyo extremo distal se introdujo hasta el fondo del tubo de ensayo para asegurar una distribución homogénea del ozono. El otro extremo de la sonda de alimentación estéril iba conectada al extremo terminal del generador de ozono.

Después de ozonizar el agua destilada, se sembró una asada de cada tubo en un cuadrante de placa de petri con agar BHI. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se realizó la lectura de las placas de petri para determinar si el ozono tuvo un efecto bactericida y el porcentaje de efectividad de cada

concentración. La variable a medir fue de tipo cualitativa nominal (la presencia o ausencia de colonias bacterianas en el agar BHI incubadas durante 24 horas a 37°C).

#### **5.6.2.2 Recopilación de resultados por repetición.**

La tabla de datos se utilizó para recolectar los resultados positivos y negativos de cada concentración de ozono utilizada contra las cepas bacterianas, además de los controles negativos del estudio (Ver anexo 2).

#### **5.7 Análisis estadístico.**

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia, utilizando estadística no paramétrica. Se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba de hipótesis de una variable binomial con un nivel alfa del 0.05 y una confianza de 95%.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Determinación del efecto bactericida.

La importancia del presente estudio radica en la validación de la ozonoterapia como una alternativa terapéutica natural, eficaz, económica y disponible para el tratamiento contra microorganismos patógenos de importancia en medicina veterinaria. Debido al aumento de la resistencia bacteriana resultante del incremento en la presión selectiva por el uso de antibióticos, es necesario realizar estudios que validen la aplicación de la ozonoterapia en medicina veterinaria. Para evaluar la actividad bactericida se usó el método de inyección de gas ozono (Oizumi et al., 1998). El método fue viable y reproducible para evaluar el efecto bactericida de las tres concentraciones, por lo que es útil saber que este método es aplicable en su totalidad para la realización de bioensayos contra patógenos aislados de casos clínicos veterinarios.

En este estudio se seleccionaron tres concentraciones de ozono (25, 35, 50 mg/L) en base a estudios de ozonoterapia en humanos, por la poca información sobre la actividad del ozono contra patógenos de importancia en medicina veterinaria y por poder generarlas con el equipo disponible. Las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron expuestas a las tres concentraciones de gas ozono (25, 35 y 50mg/L), la exposición de cada repetición fue de 3 minutos. Se realizaron cinco repeticiones con cada concentración de gas ozono en tubos de ensayo individuales además de los cinco tubos de control negativo para cada cepa para un total de cuarenta tubos. Después se sembró una asada de cada tubo en agar BHI en placas de petri. Las siembras fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, obteniendo los siguientes resultados.

Como se observa en los cuadros 1 y 2, las tres concentraciones de ozono utilizadas durante el experimento fueron activas contra ambas cepas bacterianas y existe una relación concentración-efecto del gas ozono contra bacterias. Los resultados demostraron que los controles negativos fueron adecuados ya que en todas las repeticiones se observó actividad positiva que resultó en saturación del medio de cultivo BHI. Con la concentración de ozono de 25mg/L utilizada contra la cepa de *S. aureus*, se obtuvo una efectividad del 80%, permitiendo el crecimiento bacteriano en 20% de las siembras. Al usar 25mg/L de concentración de ozono contra la cepa de *P. aeruginosa* el resultado fue el mismo.

La concentración de ozono de 35mg/L utilizada contra la cepa de *S. aureus* obtuvo una efectividad de 60%, permitiendo el crecimiento de colonias en un 40% de las siembras. Al usar la misma concentración contra la cepa de *P. aeruginosa* se obtuvo un efecto positivo del 80% y crecimiento bacteriano en 20% de las siembras.

Como se observa en los cuadros 1 y 2, la concentración de ozono de 50 mg/L fue más efectiva contra ambas cepas bacterianas en comparación con las de 25 y 35 mg/L, ya que en el 100% de las siembras se obtuvo un resultado positivo del ozono sin crecimiento bacteriano.

**Cuadro 1. Determinación del efecto bactericida del ozono contra *Staphylococcus aureus*.**

| Número de siembra       | Concentración de ozono. |            |             |          |
|-------------------------|-------------------------|------------|-------------|----------|
|                         | 25mg/L                  | 35mg/L     | 50mg/L      | Control. |
| <b>1</b>                | +                       | +          | -           | +        |
| <b>2</b>                | -                       | +          | -           | +        |
| <b>3</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>4</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>5</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>% de efectividad</b> | <b>80%</b>              | <b>60%</b> | <b>100%</b> | <b>/</b> |

(-) = No hay crecimiento o actividad positiva.

(+) = Si hay crecimiento o actividad negativa.

**Cuadro 2. Determinación del efecto bactericida del ozono contra *Pseudomonas aeruginosa*.**

| Número de siembra       | Concentración de ozono. |            |             |          |
|-------------------------|-------------------------|------------|-------------|----------|
|                         | 25mg/L                  | 35mg/L     | 50mg/L      | Control. |
| <b>1</b>                | +                       | +          | -           | +        |
| <b>2</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>3</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>4</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>5</b>                | -                       | -          | -           | +        |
| <b>% de efectividad</b> | <b>80%</b>              | <b>80%</b> | <b>100%</b> | <b>/</b> |

(-) = No hay crecimiento o actividad positiva.

(+) = Si hay crecimiento o actividad negativa.

En las dos siembras de *S. aureus* expuestas a ozono a una concentración de 35mg/L en las cuales hubo crecimiento bacteriano, solo se observaron diez colonias, cinco por cada siembra. En la siembra de *S. aureus* expuesta a ozono a una concentración de 25mg/L donde hubo crecimiento de bacteriano, se observaron ciento ocho colonias en una distribución similar a la de los controles negativos. Por este motivo, desde un punto de vista cualitativo, se considera que la concentración de 35 mg/L es más efectiva que la de 25mg/L contra *S. aureus*.

En las dos siembras de *P. aeruginosa* expuestas a concentraciones de 25 y 35 mg/L de ozono donde hubo crecimiento bacteriano, se observaron ocho y nueve colonias, respectivamente. La efectividad de ambas concentraciones de ozono es similar contra esta cepa bacteriana. La concentración de ozono de 50 mg/L es la que puede considerarse como la alternativa bactericida más indicada contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* por su efectividad demostrada en este estudio. Ya que ambas bacterias son ubicuas, multiresistentes, oportunistas y asociadas a infecciones nosocomiales reincidentes difíciles de controlar, es de utilidad saber que son sensibles al gas ozono, por lo que la ozonoterapia puede ser considerada como una alternativa para el tratamiento de infecciones asociadas a estos patógenos.

La información generada en este estudio valida la actividad bactericida del ozono en medicina veterinaria. Además de la potencial aplicación clínica de estos resultados, este estudio es el punto de partida para otras investigaciones, ya que es necesario validar el efecto bactericida del ozono contra otros microorganismos además de sus beneficios en patologías no infecciosas, tanto en animales de compañía como de animales de producción.

La ozonoterapia ofrece ventajas como no inducir ningún tipo de resistencia bacteriana, no requiere de un periodo de retiro para los productos y subproductos de origen animal, no tiene efectos secundarios adversos y tiene múltiples vías de

aplicación además de poderse generar a diferentes concentraciones, permitiendo adaptar los tratamientos para mascotas pequeñas ó animales de producción de gran tamaño. Por todos estos motivos se deben realizar más estudios de laboratorio y ensayos clínicos que permitan conocer todas las aplicaciones y protocolos de aplicación del ozono en medicina veterinaria.

## VII. CONCLUSIONES

- Se confirmó la actividad bactericida de las tres concentraciones (25, 35 y 50mg/L) de gas ozono contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- La concentración de ozono más efectiva fue la de 50 mg/L ya que tuvo un 100% de efectividad *in vitro* contra *S.aureus* y *P. aeruginosa*. Para esta concentración se rechaza la hipótesis nula con ambas cepas.
- Las concentraciones de ozono de 25 y 35 mg/L tienen menores porcentajes de efectividad que la de 50mg/L contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, para estas concentraciones se acepta la hipótesis nula con ambas cepas.
- La ozonoterapia puede ser utilizada en medicina veterinaria como un agente bactericida alternativo a antibióticos.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto bactericida del ozono contra otros microorganismos (bacterias, virus, hongos, protozoos) aislados de casos clínicos veterinarios.
- Determinar el espectro de susceptibilidad *in vitro* usando más cepas de cada especie bacteriana.
- Evaluar otras actividades del ozono (inmunomoduladora, antiinflamatoria, analgésica, cicatrizal) en estudios clínicos que validen el uso de la ozonoterapia en medicina veterinaria.
- Evaluar la efectividad *in vivo* de la ozonoterapia contra las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Diseñar protocolos de tratamiento para animales basados en los resultados obtenidos de los estudios realizados con gas ozono.

## IX. RESUMEN

Se evaluó el efecto bactericida *in vitro* de tres concentraciones de gas ozono (25, 35 y 50 mg/L) contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se utilizó el método de inyección de gas ozono en tubos de ensayo para exponer las bacterias diluidas en agua destilada al ozono. Se sembró una asada de cada tubo en placas de petri con agar BHI que después fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Se demostró actividad de las tres concentraciones contra ambas bacterias. La concentración de 50 mg/L demostró ser la más eficaz para eliminar ambas bacterias ya que en las repeticiones en las que se utilizó esta concentración no hubo crecimiento bacteriano de ninguna cepa. Las concentraciones de 25 y 35 mg/L permitieron el crecimiento bacteriano de ambas cepas y se considera que tienen una efectividad inferior a la concentración de 50 mg/L. Esto nos permite afirmar que existe una relación concentración-efecto en la actividad bactericida del ozono. La información obtenida de este estudio, validó la actividad biológica del ozono en medicina veterinaria. Además de la aplicación clínica de estos resultados, la información obtenida es un punto de partida para diversas investigaciones que respalden el uso de la ozonoterapia como parte del tratamiento de patologías infecciosas en medicina veterinaria.

## SUMMARY

The *in vitro* bactericidal effect of three ozone gas concentrations (25, 35 and 50 mg/L) against *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. The ozone gas injection method (Oizumi et al. 1998) was used in test tubes to expose the previously diluted in distilled water bacteria to ozone gas. Bacteria from each tube were planted in Petri dishes that contained BHI. Later they were incubated at 37°C for 24 hours.

Activity from the three ozone gas concentrations against both bacterial strains was demonstrated. The 50 mg/L concentration proved to be the most effective to eliminate both bacterial strains, since it did not allow any bacterial growth in any repetition during the test. The 25 and 35 mg/L ozone gas concentrations allowed the growth of both bacterial strains and are considered to have an inferior effectiveness to the 50 mg/L concentration. The information obtained from this study validated the biological activity of ozone in veterinary medicine. Besides the clinical application of these results, they are a starting point for diverse investigations that might back up the use of ozone gas as part of the treatment of infectious pathologies in veterinary medicine.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Arencibia, J., Leyva, Y., Collymore, A., Araujo, J. (2006). Producción científica sobre aplicaciones terapéuticas del ozono. *ACIMED*. 14 (1) Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1024-94352006000100007&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1024-94352006000100007&script=sci_arttext&tlng=en)
- Ateramex. (2016). Generador de ozono medicinal modelo cvtox, manual de operación. Recuperado de [http://www.ateramex.com.mx/Info\\_web/Manual%20de%20operacion%20Doktor%20Ozono%20CVTOX\\_.pdf](http://www.ateramex.com.mx/Info_web/Manual%20de%20operacion%20Doktor%20Ozono%20CVTOX_.pdf)
- Becton, Dickinson and Company. (2013). Brain Heart Infusion (BHI) Agar. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- Cars, O., Liselotte, H., Murray, M., Nordberg, O., Sivaraman, S., Ludborg, C. (2008). Meeting the challenge of antibiotic resistance- A concerted global response is needed to tackle rising rates of antibiotic resistance. doi: [org/10.1136/bmj.a1438](https://doi.org/10.1136/bmj.a1438)
- Fernandez, I., Bataller, M., Hernández, C., Sánchez, E., Morales Y. (2009). Actividad antimicrobiana de los subproductos generados por la reacción del ozono con los microorganismos. *CENIC*. 41 (2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220595006>
- Ilzarbe, L. (2000.). El Ozono: GENERALIDADES. APLICACIONES en MEDICINA y ODONTOLOGÍA. *CEEI*. 2 (18), 36-42 Recuperado de [http://www.ateramex.com.mx/Info\\_web/El%20Ozono%20GENERALIDADES.%20APLICACIONES%20en%20MEDICINA%20y%20ODONTOLOGIA.pdf](http://www.ateramex.com.mx/Info_web/El%20Ozono%20GENERALIDADES.%20APLICACIONES%20en%20MEDICINA%20y%20ODONTOLOGIA.pdf)
- Menéndez, S. Gonzáles, R. Ledea, O. Hernández, F. León, O. Díaz, M. (2008). Ozono, Aspectos básicos y aplicaciones clínicas. Habana, Cuba: CENIC.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y,... Van Bambeke F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *EPUB*. 13 (6), 560-578 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x



- Oizumi M, Suzuki T., Uchida M., Furuya J., Okamoto, Y. (1998). In vitro testing of a denture cleaning method using ozone. *The National Center for Biotechnology Information*, 45 (2),135-9. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11186199>
- Okano. (2009). Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nature Reviews Microbiology*. 7 (9), 629–641. Doi: [org/10.1038/nrmicro2200](https://doi.org/10.1038/nrmicro2200)
- Serra , M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (3), 402-419. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es>.
- Stanchi, N. (2007). Microbiología Veterinaria. Guadalupe, Argentina. Inter-Médica.
- Vidal, L. (2009). Utilidad potencial de la Ozonoterapia en la Medicina Veterinaria. *REDVET*. 10 (10), 1-13. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/ n101009/ 100909.pdf>



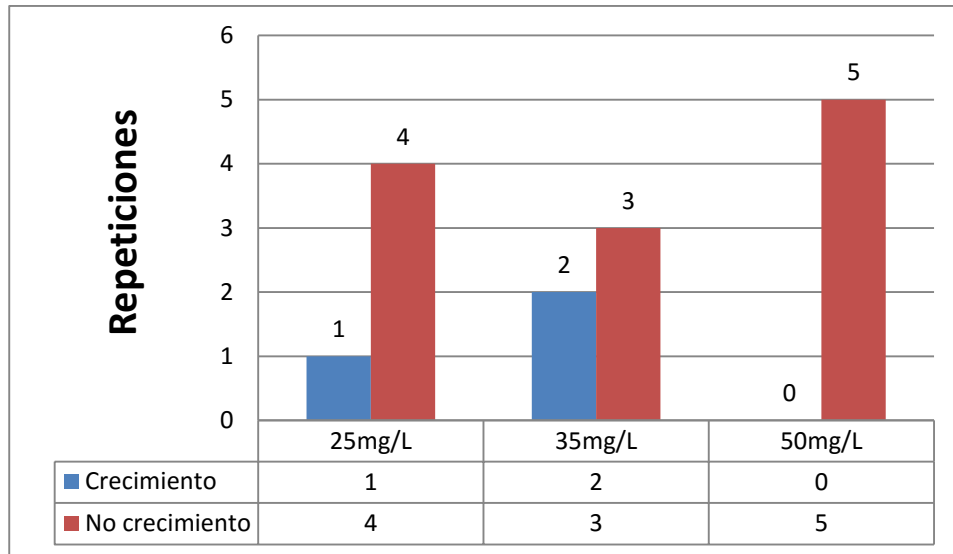
## **XI. ANEXOS.**

## Anexo 1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

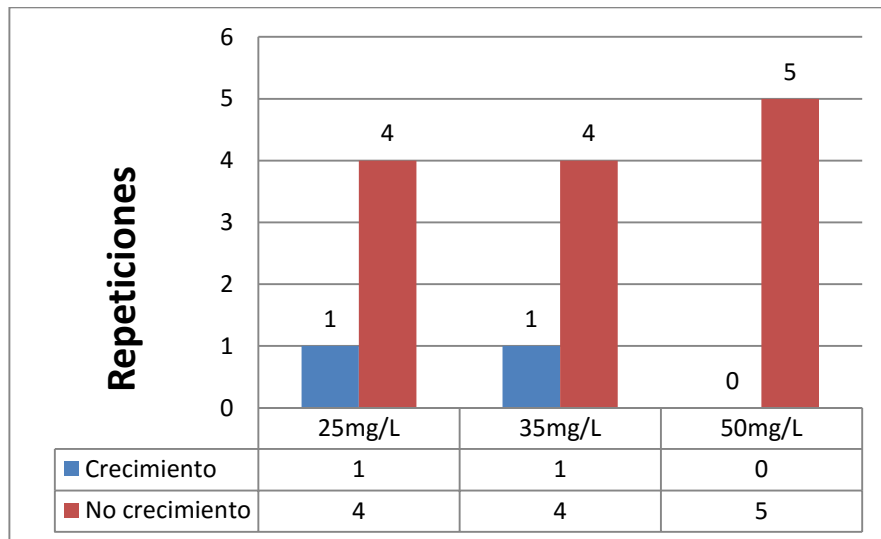
|                                                       |
|-------------------------------------------------------|
| • FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. |
| • Ho: hipótesis nula.                                 |
| • mg/L: miligramos/Litro.                             |
| • nm: nanómetros.                                     |
| • ppm: partes por millón.                             |
| • UFC/ml: unidades formadoras de colonias/mililitro.  |
| • USAC: Universidad de San Carlos de Guatemala.       |

## Anexo 2. HOJA DE RECOPIACIÓN DE DATOS POR REPETICIÓN.

| Cepa/Concentración de Ozono   | Control. | Baja (25 mg/L) | Media (35 mg/L) | Alta (50 mg/L) |
|-------------------------------|----------|----------------|-----------------|----------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>  |          |                |                 |                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |          |                |                 |                |



**Anexo 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DE TRES CONCENTRACIONES DE OZONO CONTRA *Staphylococcus aureus*.**



**Anexo 4. EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *IN VITRO* DE TRES CONCENTRACIONES DE OZONO CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*.**

**Anexo 5: CRECIMIENTO DE COLONIAS DE *Staphylococcus aureus* EN AGAR BHI.**

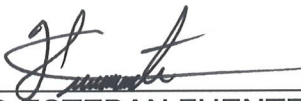
| Siembra      | Concentración de ozono. |           |          |
|--------------|-------------------------|-----------|----------|
|              | 25 mg/L                 | 35 mg/L   | 50 mg/L  |
| <b>1</b>     | 108                     | 5         | 0        |
| <b>2</b>     | 0                       | 5         | 0        |
| <b>3</b>     | 0                       | 0         | 0        |
| <b>4</b>     | 0                       | 0         | 0        |
| <b>5</b>     | 0                       | 0         | 0        |
| <b>Total</b> | <b>108</b>              | <b>10</b> | <b>0</b> |

**Anexo 6: CRECIMIENTO DE COLONIAS DE *Pseudomonas aeruginosa* EN AGAR BHI.**

| Siembra      | Concentración de ozono. |          |          |
|--------------|-------------------------|----------|----------|
|              | 25 mg/L                 | 35 mg/L  | 50 mg/L  |
| <b>1</b>     | 8                       | 9        | 0        |
| <b>2</b>     | 0                       | 5        | 0        |
| <b>3</b>     | 0                       | 0        | 0        |
| <b>4</b>     | 0                       | 0        | 0        |
| <b>5</b>     | 0                       | 0        | 0        |
| <b>Total</b> | <b>8</b>                | <b>9</b> | <b>0</b> |

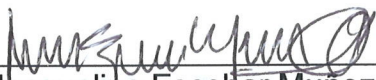
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EFFECTO BACTERICIDA IN VITRO DE TRES  
CONCENTRACIONES DE GAS OZONO CONTRA CEPAS  
DE *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.**

f.   
FEDERICO ESTEBAN FUENTES LUCERO

f.   
M.V. Otto Leonidas Lima Lucero  
ASESOR PRINCIPAL

f.   
M.A. Dora Elena Chang de Jo  
ASESOR

f.   
Dra. Jacqueline Escobar Muñoz  
EVALUADORA

IMPRIMASE

f.   
M.A. Gustavo Enrique Taracena Gil  
DECANO

