

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

Capítulo VI, Art. 46

“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”

PUBLICADO BAJO LA LICENCIA CREATIVE COMMONS

Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Unported.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



“No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.”

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

**UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DOCTORADO EN MEDICINA**



**UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO**
SAN SALVADOR, EL SALVADOR C. A.

“Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina”

Tesis presentada para optar al título de Doctorado en Medicina

Autores:

Aquino Obando, Ana Lorena
Caceros Díaz, Salvador Alejandro
Escobar Magaña, Carlos Eduardo

Asesor:

Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio Menjívar

Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador 29 de Enero de 2019



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR C. A.

Autoridades:

Dr. José Enrique Sorto Campbell
RECTOR

Dr. David Escobar Galindo
RECTOR EMÉRITO

Dr. José Nicolás Astacio Soria

**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. LUIS EDMUNO
VÁSQUEZ**

COMITÉ EVALUADOR

Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares
PRESIDENTA

Dr. William Andrés Hoyos Arango
PRIMER VOCAL

Dra. Cecilia Ivette Romero de Sobenes
SEGUNDO VOCAL

Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio Menjívar

ASESORA

Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador 29 de Enero de 2019

Carta de aprobación (orden de imprimatum)

UNIVERSIDAD "DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO"
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. LUIS EDMUNDO VASQUEZ

2

ACTA DE EVALUACIÓN DE TESIS POR EL JURADO

En la ESCUELA DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO,
a las quince horas con treinta minutos del día 29 del mes de enero de 2019
reunidos los suscritos miembros del jurado examinador de la Tesis de Grado titulada:

TEMA:

Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina

Presentada por los egresados:

1. **Ana Lorena Aquino Obando**
2. **Salvador Alejandro Caceros Díaz**
3. **Carlos Eduardo Escobar Magaña**

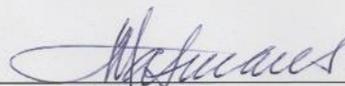
Para optar al Grado de:

DOCTOR EN MEDICINA

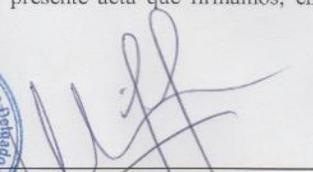
HACE CONSTAR QUE: Habiendo revisado y evaluado en forma individual su contenido escrito, de conformidad al Art. 41, 42 y 43 del Reglamento de Graduación
ACORDARON DECLARARLA:

- APROBADA SIN OBSERVACIONES** ✓
- APROBADA CON OBSERVACIONES**
- REPROBADA**

No habiendo más que hacer constar, damos por terminada la presente acta que firmamos, entregando el original a la Secretaría de esta Unidad Académica.


Dra. Leonor Isabel Murillo de Linares
Presidente




Dr. William Andrés Hoyos Arango
Primer Vocal


Dra. Cecilia Ivette Romero de Sobenes
Segundo Vocal

Contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
Capítulo I	3
Planteamiento del problema.....	3
Justificación	7
Objetivos	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Capítulo II	12
Marco teórico.....	12
Infecciones asociadas a la atención sanitaria.....	12
Bacterias implicadas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria.....	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	13
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Pruebas de identificación microbiológica	15
Plate Count Agar.....	15
Agar de Tripticasa de Soya	15
Tinción de Gram	16
Pruebas para identificación de <i>S. aureus</i>	16
Catalasa	16
Coagulasa	17
Agar Cromogénico para MRSA	18
Analytical Profile Index 20E.....	18
Métodos de eliminación de microorganismos.....	19
Luz.....	20
Luz ultravioleta-C.....	21
Aplicación de la luz ultravioleta-C en la eliminación de microorganismos.....	22
Luz ultravioleta-C en medicina	23
Dispositivos emisores de luz ultravioleta-C.....	23
Capítulo III	25
Metodología de Investigación.....	25

Tipo de estudio	25
Población y selección de muestra	25
Población de estudio	25
Unidad de análisis.....	25
Unidad reportante.....	25
Tamaño de la muestra.....	25
Selección de la muestra.....	26
Criterios de inclusión y exclusión	26
Criterios de inclusión:.....	26
Criterios de exclusión:	26
Operacionalización de las variables	27
Hipótesis de investigación.....	29
Diseño metodológico	30
Proceso de recolección de las muestras:	30
Contacto con representante de cada año.....	30
Charla informativa.....	30
Entrega de formulario para participar en el estudio.....	30
Recolección de membranas de estetoscopios	31
Traslado de membranas de estetoscopios al laboratorio de la Universidad Dr. José Matías Delgado	31
Pruebas en el laboratorio de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado.....	31
Inoculación con membrana de estetoscopio previo a luz ultravioleta-C.....	31
Exposición de las membranas a la luz ultravioleta-C	31
Inoculación con membrana de estetoscopio posterior a luz ultravioleta-C	32
Almacenamiento y crecimiento bacteriano en medio de cultivo PCA.....	32
Lectura de crecimiento bacteriano	32
Pruebas de identificación microbiológica	32
Uso de Agar Tripticasa de Soya	33
Protocolo de bioseguridad	33
Flujograma de análisis microbiológico a realizarse en el laboratorio de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado:.....	35
Análisis estadístico de los datos	36
Entrega de las membranas de estetoscopios y resultados a los estudiantes	36
Entrega de las membranas de estetoscopio a los estudiantes	36
Entrega de resultados a los estudiantes	36

Consideraciones éticas	37
Capítulo IV	38
Resultados	38
Crecimiento bacteriano en membranas de estetoscopios previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.....	38
Pruebas de identificación bacteriana previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C	39
Comparación de bacterias identificadas previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.....	41
Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.....	43
Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram positivas	44
Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram negativas	45
Porcentaje de eliminación bacteriana en membranas de estetoscopio posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.....	46
Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias identificadas	48
Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de MRSA, <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	50
Discusión	51
Conclusiones.....	54
Limitaciones del estudio.....	55
Recomendaciones	56
Anexos	57
Procedimiento de tinción de Gram	57
Procedimiento del test de catalasa	58
Procedimiento de test de coagulasa	59
Procedimiento para la realización del sistema API 20E	60
Resultado de pruebas bioquímicas API 20E	61
Hoja informativa para el participante	62
Formulario del consentimiento informado	64
Traslado de membranas al laboratorio de medicina UJMD.....	65
Inoculación en medios de cultivo PCA	66
Prueba preliminar según tiempo en medios de cultivo PCA.....	67
Lectura de unidades formadoras de colonia.....	68
Pruebas de identificación microbiológica	70

Resultados y recomendaciones al estudiante	75
“Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities”	77
Carta comité de ética	79
Resultado de API 20E.....	80
Permisos solicitados para realización del estudio.....	83
Referencias Bibliográficas	88

Resumen

OBJETIVO: Demostrar la eficacia de la luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial, para la eliminación de bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria, aisladas de las membranas de estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

METODOLOGÍA: De tipo cuasiexperimental, se realizó la inoculación de 66 membranas de estetoscopios de estudiantes en placas con Plate Count Agar previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C (LUV-C); se utilizó un dispositivo comercial de LUV-C a 254nm en un espacio cerrado por 10 minutos. Se realizó conteo manual de las unidades formadoras de colonia (UFC) a las 24 horas. Se identificaron las bacterias presentes por medio de pruebas microbiológicas. Se evaluó el porcentaje de reducción de UFC y si existía una diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$).

RESULTADOS: La prevalencia de membranas contaminadas fue del 97%, posterior a la LUV-C esta se redujo a 21.2%. Se identificaron 88 bacterias en las membranas: *Staphylococcus coagulasa negativa* 68.2%, *Bacillus subtilis* 21.6%, MRSA 3.4%, *Streptococcus spp.* 2.3%, *Pseudomonas aeruginosa* 1.1%, *Pseudomonas oryzihabitans* 1.1%, *Serratia fonticola* 1.1% y *Myrioides spp/Chryseobacterium indologenes* 1.1%. Posterior a la aplicación de LUV-C se aislaron 14 bacterias: *Staphylococcus coagulasa negativa* 92.9% y MRSA 7.1%. El promedio de UFC previo y posterior a la aplicación de LUV-C fue de 27.9 y 1.5 respectivamente. El porcentaje de eliminación promedio fue del 98%.

CONCLUSIONES: La LUV-C redujo el crecimiento bacteriano en un 98% para bacterias totales ($p < 0.0001$), 97.9% *Staphylococcus coagulasa negativa* ($p < 0.0001$), 96.9% MRSA y 100% *Pseudomonas aeruginosa*. Se determina la eficacia de un método que puede contribuir a la reducción de infecciones asociadas a la atención sanitaria, mediante su aplicación en dispositivos médicos.

Palabras clave: Infecciones asociadas a la atención sanitaria, membranas de estetoscopio, luz ultravioleta-C.

Introducción

El término infecciones asociadas a la atención en sanitaria involucra todas las intervenciones en salud que se realizan a una persona tanto dentro como fuera del ámbito hospitalario. Esta es una infección que ocurre posterior al ingreso hospitalario o que cumple con criterios como: haber recibido terapia intravenosa en casa, tratamiento de heridas, hemodiálisis, quimioterapia, que resida en un asilo de ancianos o en una institución de cuidados a largo plazo.

En Estados Unidos, se reportan anualmente 2 millones de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Es la quinta causa de mortalidad en hospitales de cuidados agudos con 90,000 muertes y un costo de entre 28 a 45 billones de dólares americanos anuales.

En un alto porcentaje de los casos estas infecciones son causadas por bacterias que presentan resistencia antimicrobiana. En los años 2009 a 2014 las bacterias más comunes con resistencia antimicrobiana en Estados Unidos fueron: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp*.

América Latina es la región con mayor prevalencia de Enterobacterias productoras de beta lactamasas de espectro extendido, presentando también altos índices de resistencia a cefalosporinas de 3 generación. Las tasas de resistencia a *Escherichia coli* más altas se encuentran en Guatemala, Honduras y México; así como altas tasas de resistencia de *Klebsiella spp*. en Argentina, Brasil, Chile, Guatemala, Honduras y Paraguay.

Estos patógenos pueden sobrevivir meses en superficies, en el caso de *Klebsiella spp*. hasta 30 meses. Se estima que 20 al 40% de estas infecciones son causadas por patógenos alojados en las manos del personal médico, que pueden contaminarse después del contacto de instrumentos como estetoscopio, esfigmomanómetro y termómetros. El estetoscopio es el instrumento más contaminado a nivel mundial y hasta el 90% de los médicos reportan no desinfectarlo periódicamente.

Las guías para la prevención de infecciones asociadas a la atención sanitaria recomiendan realizar periódicamente los procedimientos de limpieza, que debe anteceder a los demás, desinfección y esterilización. La luz ultravioleta-C es utilizada para esterilizar o desinfectar superficies, siendo capaz de eliminar bacterias, virus, hongos y esporas. Esta ha evolucionado a lo largo de la historia con aplicaciones en áreas como descontaminación de agua, alimentos, aires acondicionados, cuartos hospitalarios, etc. Se han desarrollado dispositivos portátiles de uso personal que pueden constituir una herramienta importante para la prevención e incluso el tratamiento de infecciones asociadas a la atención sanitaria.

Capítulo I

Planteamiento del problema

Desde la década de 1970 inician los sistemas de vigilancia de infecciones nosocomiales, estos se han enfocado en mejorar el manejo de este tipo de infecciones a través de la identificación oportuna de los agentes involucrados y la implementación de medidas preventivas que disminuyan el apareamiento de nuevos casos, empleando mecanismos de control para identificar un paciente afectado o la eliminación de patógenos en superficies de infraestructura, herramientas o dispositivos de uso médico.¹

Se estima que para el año 2007, en los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU) según datos del Center for Disease Control and Prevention (CDC) 1.7 millones de infecciones al año fueron asociadas a la atención médica. La National Healthcare Security Network (NHSN), una institución perteneciente al sistema de salud de EE.UU, ha logrado identificar cuáles son las formas de presentación más frecuentes de estas enfermedades, detallando en orden de incidencia las siguientes: Infecciones asociadas a dispositivos médicos, Infección de Sitio Operatorio (ISO) e infecciones debidas a *Clostridium difficile* (*C. difficile*) y *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA).^{2,3}

Estas infecciones representan una gran problemática para los sistemas en salud por lo que se ha tomado mucho interés en su estudio y clasificación, catalogándolas como un nuevo grupo llamado infecciones asociadas a la atención sanitaria, la cual toma en cuenta todas las intervenciones en salud que se realizan a una persona tanto dentro como fuera del ámbito hospitalario. La definición más utilizada desde el año 2002 es: “una infección presente al momento de la admisión hospitalaria o dentro de las primeras 48 horas posteriores que cumpla con cualquiera de los siguientes criterios: haber recibido terapia intravenosa en casa, tratamiento de heridas o cuidado especializado por enfermería en los 30 días previos; que haya asistido al hospital o clínica de hemodiálisis, haber recibido quimioterapia en los 30 días previos; que haya sido hospitalizado por más de 2 días en los 90 días previos, que resida en un asilo de ancianos o en una institución de cuidados a largo plazo.”⁴

En un esfuerzo por categorizar las infecciones asociadas a la atención sanitaria, diversos autores en EE.UU formaron un equipo multidisciplinario con el cual realizaron la revisión de 11,282 registros de pacientes pertenecientes a 183 hospitales en 10 Estados. Esta investigación reportó un porcentaje de 4% de infecciones nosocomiales para esta población. Determinando que las presentaciones clínicas más frecuentes fueron neumonía, ISO e infecciones gastrointestinales.²

A su vez parte de la importancia de esta problemática es la resistencia asociada a los patógenos que causan estas infecciones, los cuales han mostrado un patrón diferente según los períodos evaluados. Según la NHSN del CDC en su reporte de patógenos resistentes a antimicrobianos involucrados en infecciones asociadas a la atención sanitaria del 2009-2010 los principales fueron: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus spp*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus coagulasa negativa* (*S. coagulasa negativa*), *Candida spp*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Enterobacter spp*.⁵

En el reporte de la NHSN del 2011 al 2014 los principales patógenos reportados fueron en orden de frecuencia: *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella spp* y *S. coagulasa negativa*.⁶

Uno de los principales tipos de resistencia antimicrobiana es el de las Enterobacterias productoras de β -Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE); la prevalencia de infecciones por estas bacterias ha incrementado de manera significativa a nivel mundial. Aunque no se encuentran datos específicos para cada país se han realizado estudios comparativos de diferentes regiones, uno de los cuales reportó en 2009 que América Latina tiene el mayor porcentaje de producción de BLEE por *K. pneumoniae* y *E. coli* con 44% y 13.5% respectivamente. Las regiones que le siguen en orden de prevalencia son: Asia/Costa del Pacífico, Europa y Norte América.⁷

Estudios en América Latina estiman tasas de infecciones nosocomiales causadas por bacterias productoras de BLEE, con cifras de hasta 32% de *E. coli* y un 58% de *K. Pneumoniae*, además de porcentajes de resistencia a cefalosporinas de tercera generación de 10-25% y 45-53% respectivamente. Las tasas de resistencia a *E. coli* más altas se encuentran en Guatemala, Honduras y México; así como altas tasas de resistencia a *Klebsiella spp*. en Argentina, Brasil, Chile, Guatemala, Honduras y Paraguay.⁸

Un artículo de revisión en Alemania recopiló datos acerca de los microorganismos encontrados en diferentes superficies del área hospitalaria y el período de tiempo que pueden sobrevivir en estas, actuando como reservorio potencial para la transmisión de infecciones. La persistencia de las bacterias clínicamente relevantes en superficies secas fue: *Klebsiella spp.*, 2 horas - 30 meses; *E. coli*, 1.5 horas - 16 meses; *P. aeruginosa*, 6 horas - 16 meses; *S. aureus*, 7 días - 7 meses y *Enterococcus spp.*, 5 días - 4 meses.⁹

Se estima que un 20-40% de las infecciones asociadas a atención sanitaria son causadas por patógenos alojados en las manos del personal médico, que pueden

contaminarse después del contacto con las superficies de instrumentos como estetoscopios, esfigmomanómetros y termómetros.¹⁰

Un estudio prospectivo realizado en Suiza en el año 2009, demostró que existe una relación entre la contaminación microbiana de los estetoscopios con la diseminación de patógenos implicados en las infecciones asociadas a la atención sanitaria. Este mismo estudio señala que alrededor de un 90% del personal médico no desinfecta su estetoscopio posterior a su uso.¹¹

En la misma investigación se evaluó el grado de contaminación de la mano dominante y la membrana del estetoscopio del médico examinador posterior a un examen físico estandarizado, el cual incluye todos los pasos desde el frote de mano con alcohol gel, saludo al paciente con apretón de mano, examen físico de cuello, tórax, abdomen, miembros inferiores y despedida del paciente con un segundo apretón de mano. Se encontró que la contaminación por MRSA fue mayor en la membrana del estetoscopio comparada con cualquier región de la mano dominante.¹¹

En un estudio en Nigeria en el año 2010 en el que se examinaron un total de 107 estetoscopios, utilizados por doctores y enfermeras, se reportó un porcentaje de contaminación con al menos una bacteria en 78.5% de estos instrumentos. Las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *E. coli*.¹²

En el año 2013 la sociedad de infecciones asociadas a la atención sanitaria de Inglaterra propuso una guía actualizada sobre diversas recomendaciones basadas en evidencia, sobre la descontaminación adecuada del equipo médico en contacto con el paciente. Se recomienda que el equipo médico deba ser descontaminado después de cada uso como por ejemplo con soluciones a base de alcohol o jabones que no dañen el material, sin embargo, estudios realizados en base a la frecuencia de su limpieza, demuestran que no existe una apropiada práctica para esto, además existe una relación directa con la pobre adherencia a las medidas recomendadas y el aumento de microorganismos patógenos.¹³

La efectividad del uso de desinfectantes ha sido una parte importante para prevenir las infecciones asociadas a la atención sanitaria. Este enfoque preventivo ha tomado aún más atención debido al aumento de la resistencia bacteriana, especialmente con los microorganismos más resistentes, esporas, micobacterias y enterobacterias.¹⁴

La luz ultravioleta-C ha demostrado una alta capacidad de desinfección, empleándose para la eliminación de bacterias y hongos tanto en dispositivos médicos como directamente sobre animales en estudios experimentales. Se han

realizado investigaciones acerca de su uso en heridas contaminadas con microorganismos con alta resistencia a antimicrobianos, observándose la eliminación completa de estos en aproximadamente 72 horas.^{15,16,17,18,19}

En un estudio en la universidad de Siena, Italia en el año 2015, se realizó una contaminación experimental de membranas de estetoscopios en un laboratorio con *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, para luego aplicar luz ultravioleta C directamente sobre estas y medir el crecimiento bacteriano previo y posterior a su aplicación, se demostró una marcada disminución de las unidades formadoras de colonias. Sin embargo, en este estudio no se incluyeron membranas de estetoscopios contaminadas por el uso en la práctica clínica y se construyó un dispositivo especialmente diseñado para emitir la luz directamente sobre las membranas.¹⁰

Dada la evidencia que ha demostrado la efectividad de la luz ultravioleta-C para la eliminación de patógenos, la falta de investigación en cuanto a su aplicación sobre instrumentos de uso médico cotidiano y la ausencia de evaluación de dispositivos comerciales capaces de emitir la luz para este fin, es importante determinar si la luz ultravioleta-C es eficaz en la eliminación de bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria presentes en estetoscopios en El Salvador.

Justificación

Uno de los desafíos más importante en el siglo XXI que enfrentan los sistemas de salud a nivel mundial es el control y la prevención de las infecciones asociadas a la atención sanitaria, las cuales se relacionan con efectos directos sobre la morbimortalidad de las poblaciones en todos los estadios de la vida, especialmente las que necesitan atención hospitalaria continua, debido a sus diversas condiciones clínicas; también presentan efectos indirectos como: el impacto económico y el aumento de la resistencia a antimicrobianos.

En Estados Unidos, se reportan anualmente 2 millones de infecciones asociadas a la atención hospitalaria, con un aproximado de 90,000 muertes, siendo la quinta causa de muerte en los hospitales de cuidados agudos. Según datos reportados por el CDC en la NHSN se calcula un costo anual por infecciones asociadas a la atención hospitalaria de entre 28 y 45 billones de dólares americanos.²⁰

Estas instituciones priorizan y basan sus costos de acuerdo con los principales tipos de infecciones nosocomiales y su prevalencia. Los costos a nivel nacional de EE.UU de las 5 infecciones nosocomiales más comunes son: Infección del sitio operatorio \$3,297,285,451, neumonía asociada a ventilador \$3,094,270,016, bacteriemia asociada a catéter central \$1,851,384,347, infecciones por *C. difficile* \$1,508,347,070, infecciones de vías urinarias asociadas a catéter urinario \$27,884,193 con un total en conjunto de \$9,779,171,077. Dentro de las infecciones reportadas los autores especifican que una gran proporción de estas son debido a MRSA.³

Esto cobra aún mayor importancia a nivel de países de la región Latinoamericana, en los cuales se cuentan con recursos y presupuestos limitados, baja cobertura de servicios de atención en salud a la población y falta de políticas actualizadas que velen por esta problemática.²¹ También la información que se encuentra de la prevalencia, morbimortalidad y costo de las infecciones asociadas a la atención sanitaria es sumamente limitada y desactualizada, solo se cuentan con estudios en ciertos países que evalúan prioritariamente las unidades de cuidados intensivos. Además de que se encuentran ciertas investigaciones que combinan esta región con otras como Asia, África y Europa, por lo que no son datos que pueden ser utilizados de manera fidedigna y específica para esta región.²²

En un estudio realizado en la provincia de Pinar del Río en Cuba, se evaluó la prevalencia de infecciones asociadas a la atención sanitaria en el Hospital General Abel Santamaría Cuadrado, y se encontró una tasa de 2,2 infecciones por cada 100 egresos, siendo la afección respiratoria la más frecuente, además se determinó un riesgo de mortalidad por este tipo de infección de 4 por 1,000 egresos. Los microorganismos que con mayor frecuencia se aislaron fueron *E. coli* y enterobacterias.²³

En un estudio realizado en Brasil en el que se evaluó el sistema nacional de vigilancia en infecciones asociadas a la atención sanitaria se reportan datos de 99 hospitales localizados en las capitales estatales con porcentajes de 13.1% divididos en 4 principales sitios de infección: respiratorio 28.9%, quirúrgico 15.6%, piel 15.5% y urinario 11%. Sin embargo, los autores reconocen que estos datos tienen la limitación de haberse recolectado solo en este tipo de hospital, además de haber tenido poco apoyo de las instituciones estatales.²⁴

Otro estudio desarrollado en Argentina en el que se evaluaron 4,249 pacientes provenientes de 39 hospitales de 23 provincias encontró porcentajes de infección de 11.3% con un predominio en pacientes masculinos, las infecciones más comunes fueron neumonía, infección de vías urinarias, infección de sitio operatorio, bacteriemia primaria e infecciones de tejidos blandos. En este además se hizo la comparación con otras estadísticas de Inglaterra y África del Sur, demostrando porcentajes mayores en Argentina.²⁵

Además, con respecto a la resistencia a antimicrobianos en infecciones asociadas a la atención sanitaria se ha determinado que más del 70% de las bacterias involucradas demuestran ser resistentes por lo menos a un antibiótico utilizado típicamente en su tratamiento.^{26,27} Incluso se han realizado estimaciones acerca del costo promedio según el tipo de patógeno calculando por ejemplo para MRSA un costo de 4000 dólares por paciente.³

En base a estos datos y al incremento de la problemática acerca de este tema es importante promover la investigación y el desarrollo de métodos para la prevención y el control de infecciones asociadas a la atención sanitaria. En el año 2006, el CDC publicó una guía que busca estandarizar las prácticas de desinfección y esterilización. Esto con el fin de cumplir estándares de calidad a nivel nacional e internacional que logren prevenir la contaminación e infección por microorganismos nosocomiales. Esta guía define esterilización como un proceso que destruye o elimina todas las formas de vida microbiológica, utilizando métodos físicos y químicos que incluyen vapor, óxido de etileno (ETO), plasma de peróxido de hidrógeno y ácido paracético líquido. La limpieza es la eliminación de la suciedad visible, en la superficie de los objetos y normalmente se realiza manual o mecánicamente usando agua, detergentes o productos enzimáticos, es esencial para una desinfección y esterilización adecuada. La desinfección se describe como un proceso que elimina o disminuye la cantidad de microorganismos con potencial infeccioso, para esto se suelen utilizar químicos líquidos, algunos utilizados en el cuidado del equipo médico son alcoholes, glutaraldehído, formaldehído, peróxido de hidrógeno, yodóforos, ácido paracético, fenólicos, compuestos de amonio cuaternario y cloro.¹⁴

La luz ultravioleta-C ha tenido una larga historia de uso para el control de infecciones y últimamente ha tenido un avance significativo en su aplicación para el desarrollo de nuevas tecnologías de descontaminación. Se ha demostrado que dispositivos móviles emisores de luz ultravioleta-C, con una irradiación a 3 metros de distancia por 5 minutos, son capaces de descontaminar superficies en cuartos de hospitales con MRSA, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.²⁸

La luz ultravioleta-C ha demostrado ser efectiva para la eliminación de microorganismos productores de esporas. Un estudio realizado en 2 hospitales de cuidados agudos en Estados Unidos en el año 2014 encontró que la irradiación por 10 minutos a 4 pies produjo una reducción significativa en la cantidad de MRSA, *Enterococcus* resistente a Vancomicina y esporas de *C. difficile*.²⁹

Se ha evaluado la capacidad de la luz ultravioleta-C para disminuir las infecciones asociadas a la atención sanitaria. Un estudio en el que se aplicó un protocolo de descontaminación con luz ultravioleta-C en un servicio completo entre el año 2012 al 2013 demostró una reducción del 34.2% de este tipo de infecciones.³⁰

Diferentes objetos dentro del ambiente hospitalario suponen una fuente de contaminación para las infecciones asociadas a la atención sanitaria. Una investigación aisló *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* y *Enterobacter* en los teclados de las computadoras utilizadas en las unidades de cuidados intensivos. En esta misma se encontró que la luz ultravioleta-C produjo una reducción bacteriana de 99.2% y 99.6% posterior al ser aplicada por 6 y 10 minutos respectivamente.³¹

Con el avance tecnológico las fuentes emisoras de luz ultravioleta-C se han vuelto más compactas y accesibles a la población general. Un estudio demostró la eficacia de un dispositivo emisor de luz ultravioleta-C portátil, capaz de ser utilizado por una sola mano para la desinfección de superficies y objetos del área hospitalaria contaminadas por MRSA y *C. difficile*.³²

Al encontrarse en un ambiente hospitalario, los artículos personales que se encuentren cerca del paciente enfermo pueden contaminarse con bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención hospitalaria las cuales representan un riesgo tanto dentro como a fuera del hospital. Una investigación evaluó la utilización un dispositivo cerrado emisor de luz ultravioleta-C para la desinfección de objetos del paciente, el cual mostró ser efectivo para la eliminación de Adenovirus y *C. difficile*.³³

En la actualidad existe un amplio número de dispositivos comerciales emisores de luz ultravioleta-C diseñados para la desinfección de múltiples objetos como por ejemplo: artículos de salón de belleza, aseo personal, dispositivos electrónicos de uso cotidiano e incluso agua para el consumo humano.³⁴ Sin embargo, existe un número reducido de estudios que evalúan su eficacia, en mucho de los cuales los autores refieren tener

limitaciones para sus investigaciones y sugieren complementarlas con nuevos trabajos.^{35,36}

Lastimosamente en El Salvador no se cuenta con ningún estudio publicado en el que se evalué la presencia de microorganismos asociados a la atención sanitaria en herramientas de uso médico como lo es el estetoscopio, así como de la efectividad de métodos de descontaminación de estos.

Si bien existen estudios con información concluyente en cuanto a la efectividad de la luz ultravioleta-C para la eliminación de microorganismos en superficies de instrumentos de uso médico cotidiano, específicamente el estetoscopio, en estos se han utilizado dispositivos sumamente especializados, los cuales incluso en algunas ocasiones han tenido que ser creados y no son de fácil acceso. No existe un estudio en el que se haya evaluado el uso de dispositivos comerciales que emitan luz ultravioleta-C accesibles al personal de salud para la descontaminación de sus instrumentos.

Objetivos

Objetivo general

Demostrar la eficacia de la luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial, para la eliminación de bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria, aisladas de las membranas de estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar microbiológicamente bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria a partir de las membranas de los estetoscopios de los estudiantes de Doctorado en Medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado.
2. Determinar la eficacia de la luz ultravioleta-C para la eliminación de MRSA, *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante el subcultivo de las membranas de los estetoscopios tratados con este procedimiento.

Capítulo II

Marco teórico

1. Infecciones asociadas a la atención sanitaria

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria son aquellas que se adquieren posterior a procesos de atención médica dentro y fuera del ámbito hospitalario. Estas se han convertido en una de las principales problemáticas en salud a nivel mundial, incrementando su incidencia de manera significativa en los últimos años. El comportamiento de este fenómeno es multifactorial y ha sido vinculado al uso de instrumentos médicos invasivos, administración irracional de antibióticos, procedimientos quirúrgicos, contaminación de sistemas de aire acondicionado, propiedades físicas de los establecimientos sanitarios y nivel socioeconómico del país. Estas generan un alto impacto en la morbilidad y costos en los sistemas de salud de cada país.³⁷

Desde el siglo XIX médicos europeos establecen la importancia de medidas higiénicas como el lavado de manos, evitar el hacinamiento y la ventilación adecuada de los establecimientos sanitarios para evitar complicaciones infecciosas en la atención de pacientes. A lo largo de la historia se ha reportado un aumento exponencial de las infecciones asociadas a la atención sanitaria, especialmente en el siglo XXI, en el cual la mortalidad por estas se compara a la ocasionada por accidentes aéreos y automovilísticos. Los microorganismos que más han incrementado su incidencia son MRSA y *C. difficile*.³⁸

Las infecciones asociadas a la atención sanitaria pueden clasificarse de diferentes maneras. Según el procedimiento realizado éstas pueden ser: Bacteremias asociadas a catéter central, infecciones urinarias asociadas a catéter, infecciones de sitio operatorio y neumonías asociadas al uso de ventilador. Según el microorganismo causal estas pueden ser ocasionadas por virus, hongos y bacterias. Dentro de los virus causales de infecciones asociadas a la atención sanitaria se encuentran el virus de Hepatitis B, C, Rotavirus, VIH, Herpes simple e Influenza. Los agentes fúngicos tienen importancia en pacientes inmunocomprometidos en los que se desarrollan infecciones por *Aspergillus spp.*, *Candida albicans* (*C. albicans*) y *Cryptococcus neoformans*.³⁹

Las bacterias son los principales microorganismos causantes de estas infecciones adquiriendo mayor relevancia debido a su resistencia a los antibióticos. Las bacterias más frecuentes implicadas en estas son: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, y *Streptococcus spp.*⁴⁰

2. Bacterias implicadas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria

2.1 *Staphylococcus aureus*

Es una de las principales bacterias involucradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria, con relevancia epidemiológica para el desarrollo de múltiples enfermedades, como la bacteriemia asociada al uso de catéter central e infecciones de piel y tejidos blandos. Se ha separado este tipo de infección según su susceptibilidad y resistencia a la Metilina, siendo el MRSA uno de los microorganismos de mayor interés epidemiológico. Sin embargo, estudios han demostrado que el *Staphylococcus aureus* Sensible a Metilina (MSSA) es más frecuente en este tipo de infecciones.^{41,42}

El *S. aureus* ha demostrado ser fuente de contaminación tanto afuera como dentro del ambiente hospitalario, con la capacidad de formar biofilms o conglomerados de bacterias que secretan una capa protectora con difícil penetración de antimicrobianos. La superficie contaminada puede involucrar instrumentos de uso cotidiano del personal médico y de enfermería. Esta es la principal bacteria aislada en lapiceros, estetoscopio, celulares, gabachas y tensiómetros. Estudios han demostrado la presencia de MRSA en hasta un 31.4% de los tensiómetros.^{43,44,45}

La realización extrahospitalaria de procedimientos invasivos como administración de antibióticos, diálisis y quimioterapia ha provocado el apareamiento de nuevas cepas de MRSA en establecimientos de salud más pequeños y cercanos a la comunidad. Este tipo de cepas no demuestran ninguna diferencia en cuanto su comportamiento, tipo de infección que producen y sus complicaciones.⁴⁶

Otra cepa en la que se ha puesto interés recientemente es el MRSA adquirido en la comunidad, ya que se ha convertido en un microorganismo causante de infecciones asociadas a la atención sanitaria. Esta bacteria constituye una fuente infecciosa común en el ambiente extrahospitalario.⁴¹

2.2 *Escherichia coli*

En los últimos años *E. coli* se ha convertido en una de las bacterias involucradas en infecciones de origen nosocomial con más relevancia. En diferentes estudios encabeza la lista de infecciones asociadas a la permanencia en unidades de cuidado intensivos, produciendo en la mayoría de los casos, infecciones de vías urinarias asociadas al uso de catéter e infecciones de tejidos blandos.^{47,48}

Además de su elevada incidencia muchas de las cepas de *E. coli* se han vuelto productoras de BLEE, esto relacionado con el amplio uso no racional de antibióticos. Este tipo de resistencia ha demostrado un comportamiento más agresivo y de difícil manejo, asociado con una mayor morbimortalidad. Otros antibióticos a los que *E. coli*

ha desarrollado resistencia en el contexto de infecciones asociadas a la atención sanitaria son Ciprofloxacina, Gentamicina, Tobramicina y Trimetoprim/Sulfametoxazol, siendo hasta en un 43.8% resistente a múltiples antimicrobianos.^{49,50}

Las principales fuentes de contaminación para *E. coli* en el ambiente sanitario son: agua, comida e instrumentos médicos infectados. En presencia de ambientes húmedos esta bacteria presenta crecimiento y persistencia. Esta es la segunda bacteria más frecuente presente en estetoscopios. La capacidad de formar biofilms es un factor determinante para la forma de presentación, su manejo y pronóstico. La cepa uropatogénica es la que se asocia a la formación de biofilms en el tracto urinario, secundario al uso de catéter.^{44,51,52}

Se debe realizar la diferenciación entre el origen de las cepas de *E. coli*, separándolas entre las adquiridas en la comunidad y las involucradas en la atención sanitaria. Se ha demostrado un comportamiento desigual entre las cepas, teniendo una morbilidad significativamente mayor, las originadas en el ambiente sanitario.^{50,53}

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Otro patógeno predominante en el ambiente hospitalario, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, es la *P. aeruginosa*. Esta bacteria tiene la característica de contaminar superficies e instrumentos médicos, ambientes en los cuales se dificulta su erradicación. Se ha demostrado que los principales factores de riesgo para su infección son la presencia de la bacteria en el área hospitalaria, especialmente en el agua de grifo y el uso de ventilación mecánica invasiva.⁵⁴

Esta bacteria frecuentemente produce brotes epidémicos en unidades de cuidados intensivos neonatales, pediátricos y de adultos. En muchas ocasiones, el origen de los brotes puede rastrearse a superficies contaminadas relacionadas con agua, como por ejemplo: grifos, lavamanos, inodoros, duchas y drenajes. Se ha demostrado la capacidad que tiene esta bacteria de formar biofilms sobre este tipo de superficies.⁵⁵

Otra de las formas de diseminación de la *P. aeruginosa* es a través del aire. Se han aislado bacterias en muestras de aire en unidades de cuidados intensivos, salas de partos y salas de operaciones. De las muestras aisladas, un alto número de cepas resultaron poseer múltiples patrones de resistencia, siendo las productoras de BLEE las más frecuentes.⁵⁶

La resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Ha tenido mayor auge en los últimos años, con un preocupante aumento de la resistencia a fármacos de última generación, como los Carbapenémicos. Con el avance de la genética se ha demostrado la presencia de genes asociados a la resistencia para ciertas clases específicas de antibióticos; estos genes pueden ser heredados o pueden surgir a consecuencia de mutaciones

vinculadas a la exposición con estos fármacos. Varios estudios han demostrado una relación entre la exposición a antibióticos (a nivel individual y ambiental) y la adquisición de resistencia posterior. Se ha demostrado por medio de estudios filogenéticos el origen de los ancestros de cepas resistentes, hace unas pocas décadas previas.^{57,58,59}

3. Pruebas de identificación microbiológica

Existe una gran variedad de pruebas de identificación microbiológica útiles para las bacterias involucradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria. Estas incluyen medios de cultivo, tinciones, pruebas bioquímicas, genéticas e inmunológicas. Por motivos del estudio a realizar se priorizarán las pruebas relacionadas con la identificación de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.^{60,61,62}

3.1 Plate Count Agar

Desde el año de 1960 se describe la metodología para realizar el conteo estándar en placas de cultivo, uno de los principales medios utilizados para tal fin es el "Plate Count Agar". Este procedimiento es empleado hasta la fecha para la medición de contaminación bacteriana en muestras de agua potable y alimentos. Este consiste en el cultivo en un medio no selectivo, transparente, que contiene una variedad de nutrientes que son requeridos y facilitan el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos. Existen diferentes métodos de preparación e inoculación estandarizados. Actualmente se acepta la incubación a temperaturas de 20°C, 28°C o 35°C; la lectura puede ser realizada a las 24 h, 28 h, 72 h y 5-7 días.^{63,64}

La ventaja que ofrece este medio es el conteo visual de colonias bacterianas de forma manual o automática. Las colonias se observan con una coloración amarillo claro, de tamaños y formas que varían desde puntas de alfiler menores a 1mm hasta grandes conglomeraciones amorfas de bacterias. Típicamente la forma de inoculación es a través de diluciones decimales de muestras líquidas, sin embargo, se puede realizar la inoculación por contacto directo como por ejemplo con una membrana de estetoscopio. La principal desventaja de este tipo de medios es que la lectura es subjetiva y dependiente de la persona que la realiza.^{10,65,66}

3.2 Agar de Tripticasa de Soya

Este tipo de medio de cultivo, no selectivo, tiene la característica de permitir el crecimiento de microorganismos bacterianos y fúngicos con requerimientos nutricionales no exigentes. Se ha demostrado que los microorganismos incubados en

este medio de cultivo permanecen activos hasta 2 semanas posterior a la inoculación. Además, se ha observado la supervivencia de bacterias en este medio, congelados a una temperatura de hasta -20°C .^{67,68}

3.3 Tinción de Gram

Esta fue desarrollada en 1884 por el científico danés Hans Christian Gram y en la actualidad sigue siendo uno de los métodos más ampliamente utilizados para la identificación de bacterias. El procedimiento es relativamente sencillo y económico, a lo largo de la historia ha sufrido ciertas modificaciones para distintos tipos de muestra (tejidos, esputo, orina, sangre, etc.). Este se basa en las diferencias que presentan las paredes celulares de distintos tipos de bacterias, específicamente en la cantidad de peptidoglicano y lípidos en la pared celular externa.^{69,70,71}

Para la diferenciación se utilizan diferentes colorantes que separan las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas. Se aplica el colorante cristal violeta, el cual tiene una afinidad por el peptidoglicano que se encuentra en mayor cantidad en la pared celular de las bacterias Gram positivas, luego se aplica solución de Lugol, el cual forma un complejo con el cristal violeta que impide la salida de este al ser tratada con alcohol acetona y por último se utiliza una contratinción con safranina, esta colorea las bacterias que no reaccionaron al cristal violeta (Gram negativas). El resultado de la tinción es un color azul violeta para las bacterias Gram positivas y rosado para Gram negativas.⁷¹

El procedimiento a seguir para la tinción de Gram se resume en el anexo 1.⁷²

3.4 Pruebas para identificación de *S. aureus*

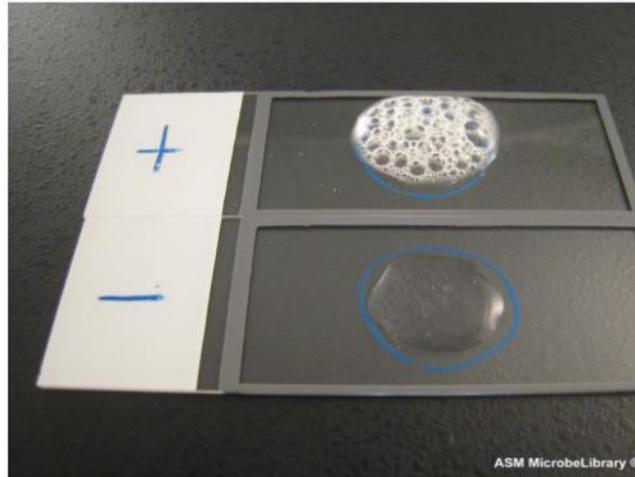
El género *Staphylococcus* se observa con la tinción de Gram típicamente como cocos Gram positivos agrupados en racimos. Existen múltiples métodos para diferenciar e identificar al *S. aureus* de las otras especies de *Staphylococcus*.⁷³

3.4.1 Catalasa

Esta permite diferenciar la familia *Micrococaceae* (catalasa positiva), de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativa). La enzima catalasa descompone las moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. De los 4 géneros de la familia *Micrococaceae* el de mayor importancia clínica es el género *Staphylococcus*, del cual existe 3 especies clínicamente relevantes: *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*, para diferenciarlos se deben de realizar otras pruebas bioquímicas.⁷⁴

El procedimiento para realizar el test de catalasa se resume en el anexo 2.⁷⁵

Imagen 1: Resultados test de catalasa



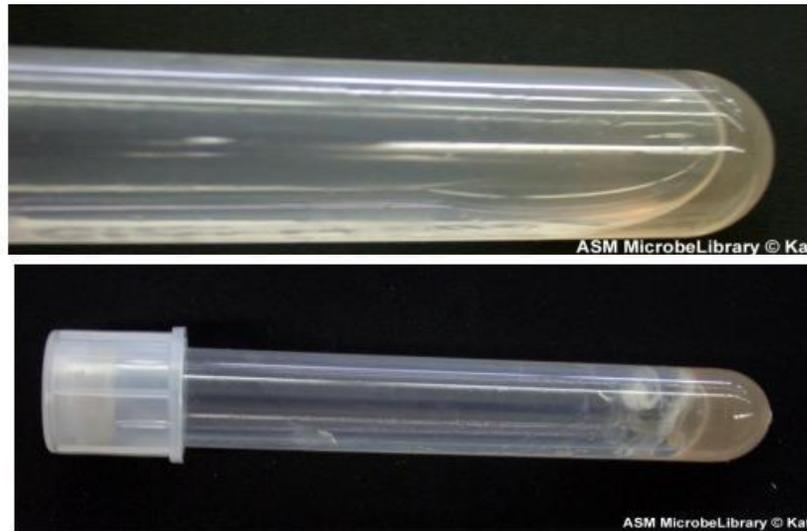
Se observan resultados de test de catalasa: *S. aureus* catalasa positiva (portaobjetos superior) y *Streptococcus pyogenes* catalasa negativa (portaobjetos inferior). Tomado del protocolo de test de catalasa de la “American Society for Microbiology”.⁷⁵

3.4.2 Coagulasa

Esta prueba se utiliza para separar al *S. aureus* de otras cepas de *Staphylococcus*, siendo la primera coagulasa positiva y el resto denominados *S. coagulasa* negativa, que son especies menos virulentas. Existen 2 formas de realizar la prueba (test en lámina y test en tubo).⁷⁴

El procedimiento para realizar el test de coagulasa se resume en el anexo 3.⁷⁶

Imagen 2: Resultado del test de coagulasa



Se observan resultados del test de coagulasa: Resultado negativo (tubo de ensayo superior) y resultado positivo (tubo de ensayo inferior). Tomada de protocolo de coagulasa, “American Society for Microbiology”.⁷⁶

3.4.3 Agar Cromogénico para MRSA

La alta prevalencia de MRSA en el ambiente hospitalario e instituciones sanitarias han impulsado el desarrollo de pruebas rápidas de identificación para este microorganismo, una de estas tecnologías es el uso de Agar cromogénico. Esta herramienta tiene múltiples aplicaciones, siendo la principal el tamizaje del personal de salud al examinar muestras nasofaríngeas para determinar si estos son portadores. Este medio de cultivo ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad al ser comparado con técnicas genéticas como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para MRSA. Existe una variedad de métodos comercializados, dentro de estos el “Brilliance MRSA 2 Agar” de Oxoid ha mostrado una sensibilidad de 99.7% y especificidad de 95.6% al ser cultivado a una temperatura de 35-37°C, con una lectura a las 24 horas. El resultado se considera positivo al encontrar colonias con color azul característico para MRSA.^{77,78}

3.5 Analytical Profile Index 20E

El Analytical Profile Index 20E (API 20E) es uno de los métodos de identificación microbiológica que utiliza múltiples pruebas bioquímicas en miniatura, esta se emplea para la determinación de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Es un método práctico y relativamente económico en forma de tiras que contienen 20 pocillos con reactivos que evalúan propiedades bioquímicas específicas. Previo a la realización del análisis se debe asegurar que la bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, para esto se lleva a cabo la prueba de Citocromo oxidasa, la cual es negativa para este tipo de bacterias.^{79,80,81,82}

El procedimiento y resultados de las pruebas bioquímicas del API 20E se resumen en los anexos 4 y 5.^{82,83,84}

Imagen 3: Resultado de API 20E



Se observa el resultado del API 20E positivo para una cepa de *E. coli*.⁸³

4. Métodos de eliminación de microorganismos

La disminución del número de infecciones asociadas a la atención sanitaria se ha relacionado con la mejora de los métodos de limpieza y desinfección en el área hospitalaria, los protocolos para la realización de estos difieren entre hospitales y países. Se ha demostrado que cuando la desinfección se aplica posterior a métodos de limpieza existen mejores resultados en la eliminación de microorganismos. A lo largo de los años se han realizado diversos cambios en la selección apropiada de desinfectantes. Se sustituyó el uso de alcohol formaldehído como mecanismo desinfectante por su alto nivel irritativo y tóxico agregándose el uso de nuevos esterilizantes como el peróxido de hidrógeno, ácido paracético, fenoles, yodóforos, alcohol isopropílico y etílico.^{14,85}

Actualmente los métodos de desinfección que inactivan o eliminan microorganismos pueden clasificarse en base a su capacidad; los de alto nivel como el peróxido de hidrogeno 7.5%, nivel intermedio el alcohol isopropílico y de bajo nivel los detergentes de acción germicida de amonio cuaternario.⁸⁵

A su vez persiste un debate en cuanto a la efectividad de los métodos de desinfección al ser utilizados en superficies, demostrando en la mayoría de los casos una eliminación de un alto porcentaje de bacterias. Sin embargo, ciertas características de estos métodos limitan su eficacia, como por ejemplo el agua empleada, la cual puede favorecer el crecimiento bacteriano. Estos además no han demostrado la capacidad para eliminar todos los patógenos como esporas bacterianas o disminuir la cantidad de bacterias por periodos prolongados. Debido al tiempo de contacto requerido se ha registrado que para ciertos microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), virus de hepatitis B y C se requiere un contacto de al menos 10 minutos, tiempo mayor al utilizado comúnmente.⁸⁶

Las bacterias encontradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria tienen la capacidad de generar mutaciones genéticas que disminuyen la susceptibilidad a los desinfectantes, un ejemplo de esto es el *S. aureus* que puede generar genes responsables de una tolerancia a la acción germicida del amonio cuaternario. Además, existe evidencia de la capacidad de transferencia de estas mutaciones genéticas entre distintas cepas, como en el caso de *S. aureus* y *E. coli*.⁸⁷

Debido a estas fallas han surgido nuevos métodos, dentro de los que se encuentran: los desinfectantes líquidos con la combinación de peróxido de hidrógeno más ácido paracético y el agua electrolizada, que han demostrado ser seguros y efectivos en la eliminación de múltiples microorganismos, incluyendo virus, bacterias y esporas. Otros métodos novedosos que entran en la categoría de “tecnologías de descontaminación sin contacto”, como el peróxido de hidrógeno vaporizado y los dispositivos móviles que emiten luz ultravioleta-C, han tenido buenos resultados en su aplicación. El uso de la luz ultravioleta-C como método de desinfección será discutido en un apartado posterior.⁸⁸

5. Luz

La luz es un fenómeno que ha sido estudiado extensamente a través del tiempo, dar una definición precisa ha sido un problema que han enfrentado grandes físicos, los cuales han intentado explicarla formulando diversas teorías, basadas en estudios y en la forma en como esta se comporta. La principal dificultad para definirla es el hecho que su comportamiento ha variado según la forma en como está diseñado el estudio. Por mucho tiempo hubo una división en la que se postulaban dos principales teorías, la luz como una partícula conocida como fotón y la luz como onda. Fue hasta el desarrollo de la mecánica cuántica en que se unificó una teoría de comportamiento dual.⁸⁹

La ciencia que estudia los fenómenos de la luz es conocida como óptica, esta se divide en tres áreas principales: la óptica física que estudia el comportamiento ondulatorio, la óptica geométrica que estudia los rayos de luz formados por partículas y como estos

interaccionan con lentes y espejos. Y la óptica cuántica que analiza la interacción de la luz y la materia con un enfoque dual.⁸⁹

Por definición un rayo de luz representa la dirección en la que se propaga la energía de una onda de luz. Este posee diferentes características útiles para diferenciar tipos específicos de luz, las tres principales son longitud de onda, amplitud y frecuencia. La longitud de onda es la distancia entre dos puntos consecutivos formados por un componente conocido como crestas de onda.⁹⁰

En base a la longitud de onda, los espectros de luz se dividen en luz infrarroja con entre 0.5 mm a 0.72 μm , luz visible entre 400 a 720 nm, luz ultravioleta entre 200 a 400 nm y extremo ultravioleta 500 a 2,000 A. La luz ultravioleta se subdivide en 4 grupos que son luz ultravioleta A de 320 a 400 nm, B de 280 a 320 nm, C de 200 a 280 nm y la luz ultravioleta de vacío de 100 a 200 nm (Tabla 1).^{19,91}

Tabla 1: Longitud de onda para los diferentes espectros de onda electromagnética⁹¹

Espectro electromagnético		
	Tipo de onda	Límites aproximados de sus longitud de onda
Dominio electrónico	Ondas de radio	1000 m – 0.50 m
	Microondas	50 cm – 0.05 mm
Dominio óptico	Infrarrojo lejano	0.5mm – 0.03 mm
	Infrarrojo cercano	30 μm – 0.72 μm
	Luz visible	720 nm – 400 nm
	Luz ultravioleta	400 nm – 200 nm
	Extremo ultravioleta	2,000 A – 500 A
Física de alta energía	Rayos X	500 A – 1 A
	Rayos gamma	1 A - 0.1 A

1 micra= $\mu\text{m}=10^{-6}$ m; 1 angstrom= 1 a = 10^{-10} m; 1 nanómetro= 1 nm = 10^{-9} m

5.1 Luz ultravioleta-C

El estudio de la luz y su separación en los diferentes tipos de ondas ha permitido determinar las características de cada dominio, creando tecnologías que aprovechan estas propiedades en una amplia variedad de aplicaciones. Una de estas tecnologías es la desinfección basada en mecanismos que utilizan luz, dentro de los que se encuentran: la luz ultravioleta-C, luz azul y la terapia fotodinámica. La luz ultravioleta-C

dentro de un rango de 250-270nm es la que presenta el mayor potencial para inactivar microorganismos, en este rango es absorbida en mayor cantidad por los ácidos nucleicos presentes en las células. Su acción bactericida esta mediada por la formación de dímeros de pirimidina y ciclobutano en las moléculas de ADN, estos provocan una falla en la replicación celular ocasionando la muerte del microorganismo.¹⁵

5.1.1 Aplicación de la luz ultravioleta-C en la eliminación de microorganismos

Los experimentos con luz ultravioleta mostraron avances desde el año de 1877, Downes y Blunt reportan la inactivación de bacterias con la utilización de luz ultravioleta, demostrando que el espectro azul-violeta es el más efectivo, dando inicio a diversos estudios que evalúan la capacidad de eliminar microorganismos. La utilización de la radiación germicida de luz ultravioleta se define como la capacidad de las ondas de la luz con un rango de 200 a 320 nm para eliminar microorganismos.⁹²

La aplicación de la luz ultravioleta-C en hospitales inicia en la década de 1930 a 1939 con el uso de esta en lámparas superiores de cuartos. Para 1950 existía suficiente evidencia que demostraba la efectividad de la luz ultravioleta-C para la desinfección de sistemas de aire y superficies, lo cual conlleva a la aplicación y desarrollo de nuevas tecnologías en el área de ingeniería. No fue hasta 2003 que el CDC reconoció formalmente su efectividad y potencial para ser utilizado en la desinfección de hospitales y aires.⁹²

Los métodos de desinfección basados en la aplicación de luz ultravioleta-C han sido empleados en múltiples ámbitos como el manejo de alimentos, agua, aires acondicionados, entre otros. En cada área se han realizado avances y modificaciones en la forma que esta es aplicada, hasta la fecha se siguen desarrollando investigaciones que estudian las características de estas tecnologías, su efectividad y los nuevos dispositivos que son creados para este fin.^{34,93,94,95}

La luz ultravioleta-C ha demostrado efectividad para la eliminación y el control de microorganismo virales como el virus de la influenza y de Hepatitis C. Esta es capaz de reducir la transmisión aérea del virus de influenza A H1N1, así como de inactivar al virus de la Hepatitis C presente en productos sanguíneos.^{96,97}

La luz ultravioleta-C tiene capacidad para inactivar una gran variedad de bacterias, dentro de las cuales se encuentran las involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria. En muchos casos es capaz de eliminar patógenos que presentan múltiples formas de resistencia a antibióticos y a otros métodos de desinfección. Estudios han demostrado actividad bactericida de la luz ultravioleta-C para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, incluso en *E. coli* y *Listeria monocytogenes* agrupadas en

biofilms. Protocolos que utilizan luz ultravioleta-C en lámpara de cuarto fueron capaces de reducir la transmisión de *M. tuberculosis*.^{18,98,99,100,101}

A su vez microorganismos fúngicos también pueden ser eliminados al utilizar luz ultravioleta-C. La aplicación de luz emitida en pulsos fue efectiva para eliminar biofilms formados por *C. albicans* y *C. parapsilosis*.^{102,103}

5.1.2 Luz ultravioleta-C en medicina

Por su capacidad demostrada para la eliminación de múltiples microorganismos, la luz ultravioleta-C ha sido utilizada en áreas de aplicación médica. Los hospitales que tienen la capacidad económica y el acceso a estas tecnologías utilizan la luz ultravioleta-C para la descontaminación de cuartos, instrumentos médicos y materiales utilizados por profesionales de salud y pacientes. Esto con la finalidad de prevenir o reducir en número las infecciones asociadas a la atención sanitaria.^{33,104,105,106,107}

Se han encontrado resultados beneficios en la aplicación de terapia con luz ultravioleta, en el manejo de manifestaciones dermatológicas de enfermedades como esclerodermia localizada morfea, vitiligo, dermatitis atópica y linfoma de células T cutáneo. Además, la luz ultravioleta-C ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de heridas cutáneas en úlceras o quemaduras contaminadas con MRSA, *P. aeruginosa* y *C. albicans*; acelerando también el proceso de reparación de la piel al provocar una reacción inflamatoria que media la proliferación celular. Sin embargo, la utilización de la luz ultravioleta-C en estas áreas se encuentra en estadios tempranos, ya que la evidencia existente proviene en su mayoría de estudios in vitro e in vivo, con una cantidad significativamente menor de estudios clínicos.^{17,18,19}

El mismo mecanismo a través del cual la luz ultravioleta-B y C producen un efecto germicida, está vinculado al desarrollo de lesiones importantes de la piel como inmunosupresión, envejecimiento y mutaciones genéticas con el desarrollo final de cáncer de piel. Sin embargo, se ha demostrado que las exposiciones limitadas a luz ultravioleta-C en el tratamiento de heridas no están relacionadas con efectos carcinogénicos, ya que las mutaciones provocadas solo son significativas al ser aplicada por un periodo prolongado de tiempo, superando los mecanismos de reparación en células eucariotas.¹⁹

5.1.3 Dispositivos emisores de luz ultravioleta-C

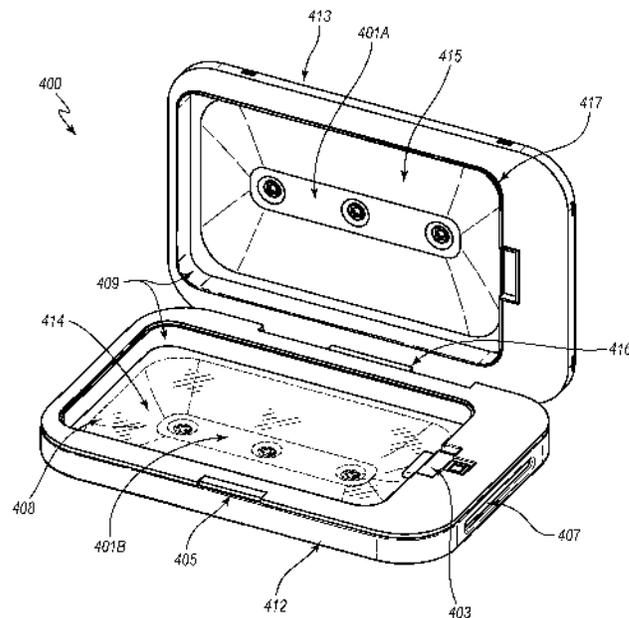
En la actualidad existe una variedad de productos emisores de luz ultravioleta-C comerciales, diseñados para la desinfección de cuartos completos a nivel hospitalario. Estos dispositivos han demostrado una alta efectividad para la eliminación de microorganismos presentes en superficies de salas de operaciones y unidades de

cuidados intensivos. Algunas de las desventajas que presentan son su alto costo, un tamaño considerable y la necesidad de emitir el rayo de luz directamente sobre la superficie a descontaminar, teniendo una menor efectividad lugares de difícil acceso.^{108,109,110}

Existen dispositivos emisores de luz ultravioleta-C comerciales de menor tamaño y costo, este tipo de dispositivos son de venta libre al público y se emplean principalmente en la descontaminación de artículos personales. Algunos de estos aparatos están diseñados principalmente para la desinfección de dispositivos móviles de uso cotidiano, estos emplean luz ultravioleta-C en cámaras cerradas que aíslan los dispositivos u objetos, evitando la exposición directa del usuario a la luz. Uno de los problemas con este tipo de dispositivo es la poca cantidad de estudios que evalúen su efectividad.^{34,35,36}

El “PhoneSoap” es un dispositivo emisor de luz ultravioleta-C diseñado para la descontaminación de teléfonos celulares, además de otros objetos de tamaño pequeño como tarjetas de crédito. Este dispositivo se encuentra a la venta al público en general y es capaz de emitir una irradiación con una longitud de onda de 254nm, la cual tiene acción bactericida.^{111,112}

Imagen 4: Dispositivo emisor de luz ultravioleta-C “PhoneSoap”



Se muestra el diseño empleado para la patente del dispositivo emisor de luz ultravioleta “PhoneSoap”.¹¹²

Capítulo III

Metodología de Investigación

1. Tipo de estudio

El estudio fue cuasiexperimental de muestras pareadas de corte transversal.

2. Población y selección de muestra

2.1 Población de estudio

Población diana: membranas de los estetoscopios de los estudiantes de la carrera de doctorado en medicina.

Población accesible: las membranas de los estetoscopios de estudiantes de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado que durante los meses septiembre y octubre de 2018 se encontraban cursando materias del área clínica en 4°, 5° y 6° año.

Estos se dividieron en 3 grupos: 60 estudiantes de cuarto año cursando la asignatura de Cirugía 1, 31 de quinto año cursando Pediatría 1 y 43 estudiantes de sexto año cursando Medicina Interna 2.

2.2 Unidad de análisis

Unidades formadoras de colonias presentes en la superficie de los cultivos de Plate Count Agar (PCA), inoculados con las membranas de los estetoscopios de estudiantes, previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C a través de un dispositivo comercial.

2.3 Unidad reportante

Resultados de las unidades formadoras de colonias presentes en la superficie de los cultivos de Plate Count Agar (PCA), almacenados en el instrumento de recolección de datos digital.

2.4 Tamaño de la muestra

No se realizó cálculo del tamaño de la muestra debido a que el estudio fue de tipo cuasiexperimental. Se incluyeron todas las membranas disponibles en los grupos de estudiantes.

2.5 Selección de la muestra

De tipo no probabilístico, por conveniencia, consecutivo.

3. Criterios de inclusión y exclusión

3.1 Criterios de inclusión:

- Estetoscopios de los estudiantes participantes.
- Estetoscopios con membranas que hayan sido adquiridas al menos 1 mes previo a la toma de muestra.
- Estetoscopios con membranas que hayan sido utilizadas en pacientes en el ámbito hospitalario por lo menos 1 vez en las 2 semanas previas a la toma de muestra.
- Estudiantes que desean participar en el estudio y que proporcionen las membranas de sus estetoscopios.

3.2 Criterios de exclusión:

- Estetoscopios con membranas que no puedan ser removidas del instrumento o que al hacerlo exista la posibilidad de dañarlo.
- Estetoscopios en los cuales hayan sido aplicados, el mismo día de la toma de muestra, cualquier tipo de método de desinfección (físicos, químicos o mecánicos).
- Estetoscopios que presenten membranas con daños considerables que dificulten su manipulación.
- Estetoscopios con membranas que no sean capaces de ser introducidas en el sistema de emisión de luz ultravioleta debido a su tamaño o a su forma.

4. Operacionalización de las variables

Variable	Definición operacional	Dimensión	Indicadores
Año de estudio	Año de la carrera de medicina que se encontraba cursando el estudiante en el momento de la muestra.	Cuarto año Quinto año Sexto año	Listado oficial de estudiantes inscritos en doctorado en medicina en la Universidad Dr. José Matías Delgado en el ciclo II-2018.
Área clínica del estudiante	Área hospitalaria en la que el estudiante se encontraba desempeñando tutorías y turnos en el hospital al momento de la toma de la muestra.	Medicina Interna Ginecología Pediatría Cirugía	Listado oficial de estudiantes inscritos en doctorado en medicina en la Universidad Dr. José Matías Delgado en el ciclo II-2018.
Unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC)	Cantidad de áreas de crecimiento bacteriano separadas, presentes en el medio de cultivo Plate Count Agar (PCA).	Número específico entre 0- 250 Mayor o igual que 250	Conteo manual de UFC, tomadas como área de crecimiento bacteriano aisladas con un diámetro mayor o igual a 1mm., realizado 24 horas posterior a inoculación en el medio PCA a una temperatura de 35° C.
Tinción de Gram	Coloración que adquirió la bacteria al realizar la coloración de Gram.	Gram positiva Gram negativa	Células moradas Gram positivas, células rosadas Gram negativas a través de visualización en microscopio de luz mediante objetivo 100x.
Tiempo de exposición a Luz ultravioleta-C	Tiempo expresado en minutos en que las membranas	0 minutos 10 minutos	Tiempo programado por el dispositivo comercial emisor de luz ultravioleta-

	<p>hayan sido expuestas a un dispositivo de luz ultravioleta C a una longitud de onda de 254 nm.</p>		<p>C PhoneSoap 3.0 empleado sobre las membranas de los estetoscopios.</p>
<p>Bacterias implicadas en infecciones asociadas a la atención sanitaria</p>	<p>Microorganismos bacterianos de relevancia clínica en las infecciones asociadas a la atención sanitaria.</p>	<p><i>S. aureus</i> MRSA <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i></p>	<p>Resultado de los test de identificación microbiológica:</p> <p><i>S. aureus</i>: coco Gram positivo agrupado en racimos con pruebas de coagulasa y catalasa positiva.</p> <p>MRSA: coco Gram positivo que presentó pruebas positivas para <i>S. aureus</i> y que tuvo un crecimiento con colonias de color azul en el medio “Brilliance MRSA 2 Agar”.</p> <p><i>E. coli</i>: bacilo Gram negativo con resultado API20E positivo para <i>E. coli</i>.</p> <p><i>P. aeruginosa</i>: bacilo Gram negativo con resultado API20E positivo para <i>P. aeruginosa</i>.</p>

5. Hipótesis de investigación

H1: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial en un lapso de 10 minutos es eficaz para la eliminación de bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria aisladas en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H0-1: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial en un lapso de 10 minutos no es eficaz para la eliminación de bacterias involucradas a infecciones asociadas a la atención sanitaria aisladas en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H2: “Existe presencia de bacterias implicadas en infecciones asociadas a la atención sanitaria en la membrana de estetoscopios en los estudiantes de medicina.”

H0-2: “No existe presencia de bacterias implicadas en infecciones asociadas a la atención sanitaria en la membrana de estetoscopios en los estudiantes de medicina.”

H3: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial es eficaz en la eliminación de MRSA aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H0-3: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial no es eficaz en la eliminación de MRSA aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H4: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial es eficaz en la eliminación de *E. coli* aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H0-4: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial no es eficaz en la eliminación de *E. coli* aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H5: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial es eficaz en la eliminación de *P. aeruginosa* aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

H0-5: “La luz ultravioleta-C emitida por un dispositivo comercial no es eficaz en la eliminación de *P. aeruginosa* aislados en estetoscopios de estudiantes de Doctorado en Medicina de 4°, 5° y 6° año de la Universidad Dr. José Matías Delgado.”

6. Diseño metodológico

6.1. Proceso de recolección de las muestras:

El estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad Dr. José Matías Delgado. La recolección de las membranas de los estetoscopios de los estudiantes se llevó a cabo en 2 tiempos, seleccionados por conveniencia para la toma de muestras y valorando no interferir en las actividades académicas de los estudiantes.

Se recolectaron las membranas de estetoscopios de los estudiantes de 4º año el martes 11 de septiembre de 2018, durante la semana de los primeros exámenes parciales, además para 5º y 6º año el lunes 22 de octubre de 2018, fecha de realización de sus segundos exámenes parciales.

6.1.1 Contacto con representante de cada año

Se comunicó con los representantes de cada año y coordinadores de las asignaturas, una semana previa a la toma de muestra y se coordinó con estas personas para que solicitaran a los estudiantes acudir a su evaluación con su estetoscopio de uso personal.

6.1.2 Charla informativa

En el aula de realización de su examen parcial a cada grupo de estudiantes se les explicó la dinámica del estudio, su participación opcional, explicando en qué consiste el estudio, como se llevaría a cabo la manipulación de membrana del estetoscopio, la confidencialidad de los resultados, el día de entrega de las membranas, día de entrega de los resultados y los posibles riesgos o daños que pudieran ocasionarse en estas. También se entregó una hoja informativa en forma física (Ver anexo 6).

6.1.3 Entrega de formulario para participar en el estudio

Los investigadores esperaron al final del examen, a medida que cada estudiante saliera se solicitó de forma individual su participación en el estudio, fue llevado a un aula asignada para la recolección de membranas y se aclaró cualquier duda acerca de la investigación. Para este fin se solicitó al estudiante que leyera detenidamente el consentimiento informado utilizado. En el caso de desear participar este completó el formulario con sus datos personales y firma (Ver anexo 7).

6.1.4 Recolección de membranas de estetoscopios

Al aceptar participar en el estudio se removió la membrana del estetoscopio del estudiante, esta se colocó en una bolsa de recolección de plástico transparente estéril, identificada con un código correlativo el cual fue entregado al estudiante para facilitar su posterior devolución y esta información se almacenó en una base de datos en Microsoft Excel, la cual incluye el nombre del estudiante y su código correlativo (Ver anexo 8).

De los estudiantes 68 aceptaron participar en el estudio, sin embargo 2 de estas membranas cumplían criterios de exclusión, por lo que no se incorporaron en la investigación. Se tomaron un total de 66 membranas de estetoscopios, 24 correspondientes a alumnos de 4° año, 26 a 5° año y 16 de 6° año.

6.1.5 Traslado de membranas de estetoscopios al laboratorio de la Universidad Dr. José Matías Delgado

Una vez recolectadas todas las membranas de los participantes estas fueron transportadas al laboratorio de medicina de la universidad, en donde según el horario de finalización del examen se realizaron las pruebas correspondientes el mismo día o el día siguiente.

6.2. Pruebas en el laboratorio de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado

6.2.1 Inoculación con membrana de estetoscopio previo a luz ultravioleta-C

En el laboratorio se retiraron las membranas de los estetoscopios de las bolsas estériles en las cuales fueron transportadas y posterior a esto se expusieron de manera directa a los medios de cultivo PCA en una caja de Petri de un compartimiento durante 5 minutos, previo a la aplicación de luz ultravioleta-C (Ver anexo 9).

Se seleccionó un tiempo de 5 minutos, posterior a realizar pruebas de crecimiento con 10 segundos, 1, 5, 10 y 20 minutos. En esta prueba se encontró un crecimiento adecuado con el tiempo seleccionado (Ver anexo 10).

6.2.2 Exposición de las membranas a la luz ultravioleta-C

Se aplicaron 10 minutos de radiación con luz ultravioleta-C de manera directa sobre las membranas de estetoscopios. Para esto se utilizó el dispositivo comercial de venta libre Phone Soap 3.0, el cual es un aparato utilizado para la descontaminación de teléfonos

celulares. Este dispositivo cumple con especificaciones utilizadas en investigaciones previas, ya que emite una onda de luz de 254nm a una distancia aproximada de 10-20mm, en un espacio cerrado y seguro para el manipulador, también siendo accesible a la población general.¹⁰ Se utilizaron dos dispositivos emisores de luz ultravioleta-C.

6.2.3 Inoculación con membrana de estetoscopio posterior a luz ultravioleta-C

Se repitió la inoculación inmediatamente posterior al haber recibido los 10 minutos de irradiación con luz ultravioleta-C.

6.2.4 Almacenamiento y crecimiento bacteriano en medio de cultivo PCA

Los medios de cultivos inoculados previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C fueron etiquetados siguiendo el código vinculado a la membrana del estetoscopio, luego se almacenaron por 24 horas en un ambiente controlado y aislado a 35°C.

6.2.5 Lectura de crecimiento bacteriano

Los resultados de los cultivos se leyeron 24 horas posterior a la inoculación, para esto se realizó un conteo manual de las unidades formadoras de colonias, estas se reportaron como el número exacto entre 0 y 250, o como mayor o igual que 250. Estos resultados se almacenaron en las bases de datos de forma pareada para la membrana específica (Ver anexo 11).

6.2.6 Pruebas de identificación microbiológica

Se encontró en muchos casos que en las placas inoculadas hubo diferentes morfologías macroscópicas de colonias, por cada placa se tomaron un máximo de 2 tipos de colonias predominantes. A las 48 horas de crecimiento en la placa inicial, se inocularon subcultivos puros a los que se realizaron las pruebas de identificación microbiológica posteriormente (Ver anexo 12).

Se realizó tinción de Gram, para diferenciar entre bacterias Gram positivas o negativas. En el caso de tratarse de una bacteria Gram positiva se realizó la prueba de catalasa, colocando la muestra con un aplicador de madera en una laminilla con una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observando la producción de burbujas. A las bacterias catalasa positiva se les realizó prueba de coagulasa, colocando un asa completa de muestra en 0.5 mL de plasma con una lectura a las 4 y 24 horas. Por razones

económicas y ante la gran cantidad encontrada de cocos Gram positivos, catalasa positiva se inició con plasma citratado de conejo y se continuo con plasma de humano.

Se encontraron *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), los cuales correspondieron a Bacilos Gram positivos agrupados en cadenas cortas, formadores de esporas, catalasa positiva con colonias características. Se determinó la presencia de *Streptococcus spp.*, con cocos Gram positivos agrupados en pares o en cadenas con resultado de catalasa negativa. Además, se definió a los cocos Gram positivos agrupados en racimos con prueba de catalasa positiva como pertenecientes al género *Staphylococcus*, los cuales fueron separados en *S. coagulasa* negativa y *S. aureus* que cuenta con prueba de coagulasa positiva. Al encontrar la presencia de *S. aureus* se cultivó en el “Brilliance MRSA 2 Agar”, con una lectura a las 24 horas, evaluando si era una cepa positiva para MRSA.

Por otro lado, al tratarse de una bacteria Gram negativa se cultivó en el agar MacConkey para inhibir el crecimiento de las Gram positivas. Posterior a esto se utilizó el sistema de identificación conocido como “Analytical Profile Index 20E” (API 20E), determinando el biocódigo específico del inoculo. Para la lectura del API 20E se introdujo este número en el sistema APIweb con la identificación específica de la bacteria.

Una vez identificada la bacteria aislada en cada membrana esta fue reportada en la base de datos de forma pareada con las unidades formadoras de colonias encontradas previa y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C, con el objetivo de analizar los datos de forma específica para las especies de relevancia para el estudio.

6.2.7 Uso de Agar Tripticasa de Soya

Este no fue utilizado debido a que todas las pruebas se realizaron en un máximo de 2 días posteriores a la inoculación de cultivos puros. El medio estaba contemplado en el caso de que las pruebas fueran realizadas en las semanas siguientes.

6.2.8 Protocolo de bioseguridad

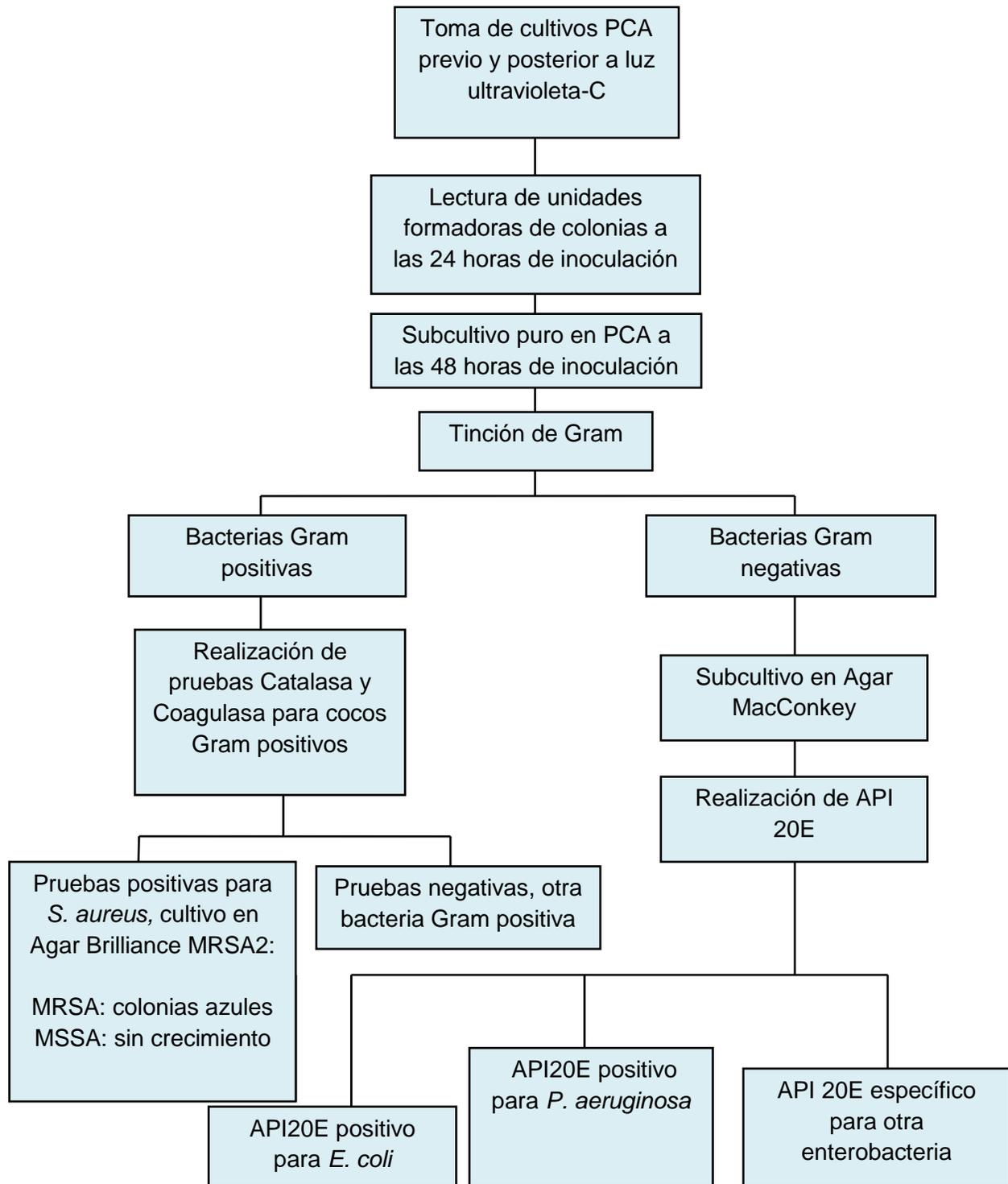
Fue seleccionado el laboratorio de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado, debido a que éste cuenta con los recursos e infraestructura que permiten desarrollar una investigación siguiendo un protocolo de bioseguridad nivel 2. Esto implica que tanto el área a trabajar como los investigadores se encuentran capacitados para manejar agentes patógenos de peligro moderado.

Dentro de las medidas de protección que se utilizaron se encuentran:

1. Restringir el uso del laboratorio a personas ajenas al estudio, especialmente el área en la que se desarrollaron las pruebas.

2. La descontaminación periódica de superficies de trabajo, previo y posterior a cada prueba realizada, posterior a la finalización de la jornada y en el caso de salpicaduras.
3. Uso de gabinete de seguridad biológica en pruebas que involucren patógenos de alto riesgo y capacidad de formar aerosoles.
4. Uso de material de protección personal que incluyen mascarillas, gabacha y guantes limpios descartables (utilizando un par de guantes para cada prueba realizada).
5. Lavado de manos con la técnica adecuada al iniciar la jornada y posterior a descartar cada par de guantes.
6. Manipulación de muestras y realización de pruebas de manera cuidadosa, evitando salpicaduras y formación de aerosoles.
7. Seguir el reglamento del laboratorio y las indicaciones del jefe de laboratorio en cuanto al espacio designado para las pruebas, almacenamiento de muestras y cultivos.
8. Seguir el protocolo del laboratorio para la eliminación de material bioinfeccioso.

6.3 Flujograma de análisis microbiológico a realizarse en el laboratorio de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado:



6.4. Análisis estadístico de los datos

Se agruparon los datos de diferentes maneras para hacer análisis sobre pareos específicos de las unidades formadoras de colonias previo y posterior a la utilización de luz ultravioleta-C. Estos grupos fueron representados mediante estadística descriptiva con tablas y gráficos que utilizaron medidas como frecuencia, porcentaje, media, mediana y rango intercuartílico.

Para lograr comprobar las hipótesis del estudio, primero se realizó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov para determinar si la muestra seleccionada tenía una distribución paramétrica o no paramétrica. Se determinó que todas las agrupaciones de muestras que se realizaron tuvieron una distribución no paramétrica.

Se utilizó la prueba de Wilcoxon para determinar si las diferencias de medianas en las unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), se seleccionó esta prueba debido a que el muestreo fue pareado con distribución no paramétrica. Además, se configuró la prueba para una cola, debido a que se espera que el grupo previo a la aplicación de luz ultravioleta-C tenga una mediana mayor.¹¹³

El programa utilizado para la base de datos fue Microsoft Excel, todas las pruebas estadísticas y gráficas fueron realizadas en el programa estadístico Graphpad Prism 8.0 (versión de prueba).

6.5. Entrega de las membranas de estetoscopios y resultados a los estudiantes

6.5.1 Entrega de las membranas de estetoscopio a los estudiantes

Las membranas se devolvieron 1 a 2 días posterior a la exposición de luz ultravioleta-C, para esto se coordinó previamente con los representantes de grupo, de manera que pudieran ser entregadas en una fecha y aula programada.

6.5.2 Entrega de resultados a los estudiantes

Los datos encontrados acerca de las bacterias aisladas en las membranas de los estetoscopios fueron entregados a los estudiantes utilizando un instrumento que especifica si hubo crecimiento o no, cual fue la bacteria aislada y una serie de recomendaciones para la eliminación de esta. Este instrumento fue entregado personalmente en un sobre sellado para garantizar la confidencialidad del resultado (Ver anexo 13 y 14).

6.6. Consideraciones éticas

El estudio desarrollado respetó los principios éticos en medicina de la siguiente forma. El principio de la beneficencia al proponer un método de descontaminación de instrumentos médicos eficaz, que ayude a prevenir infecciones asociadas a la atención en salud. La no maleficencia al utilizar un dispositivo seguro para los estudiantes y sus membranas de estetoscopios. Autonomía al respetar la decisión de participar o no en el estudio. Justicia al incluir a todos los estudiantes que desearán participar.

Se presentó el protocolo al comité de ética de la facultad de medicina ya que se consideró que la investigación realizada fue de riesgo mínimo, esto debido a que existía el riesgo teórico de producirse contaminación accidental de las membranas de los estetoscopios con bacterias que poseen capacidad infecciosa, las cuales podrían de manera excepcional ser transmitidas a los estudiantes participantes, así como a los pacientes en quienes utilizaran el instrumento posteriormente (Ver anexo 15).

Para evitar que cualquier patógeno hubiese sido diseminado fuera del estudio se utilizaron técnicas de asépticas en todo momento durante la manipulación de las membranas de estetoscopio, las cuales se realizaron según protocolos de un laboratorio de bioseguridad nivel 2, como lo es el laboratorio de ciencias de la salud de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

A su vez se mantuvo una comunicación estrecha con cada estudiante notificándole los hallazgos para su estetoscopio en específico. En caso de encontrarse un microorganismo patógeno se le proporcionaron opciones para la descontaminación y eliminación de dicha bacteria. Y en dado caso que el patógeno no pudiera ser eliminado se le propuso descartar el instrumento.

Se mantiene una absoluta confidencialidad acerca de los hallazgos en las membranas de los individuos que participaron en dicho estudio, utilizando sistemas de codificación que no incluyeron ningún tipo de identificación con la que el estudiante pueda ser reconocido fuera de los autores del estudio.

Existían riesgos teóricos secundarios a la aplicación de la luz ultravioleta-C sobre las membranas de los estetoscopios, los cuales se relacionan principalmente a desperfectos en el aparato utilizado. No se produjo ningún daño a las membranas tras su manipulación.

En el caso de haber existido algún daño el equipo investigador se hubiese hecho responsable de este. Se tomaron fotografías al momento de la recepción de las membranas, con el fin de demostrar la ausencia de daño al utilizar la luz ultravioleta-C.

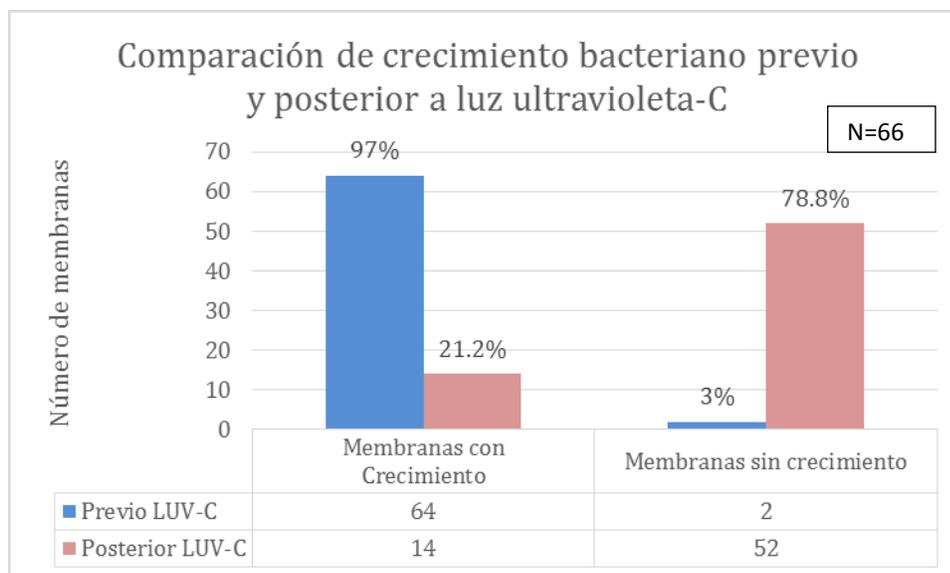
Capítulo IV

Resultados

De la población accesible (N=134) conformada por todos los estudiantes a los que se les solicitó participar en el estudio (mediante comunicación y charla informativa previa), únicamente 68 mostraron interés en participar, de los cuales 2 fueron rechazados por cumplir criterios de exclusión, resultando en una muestra final de 66 membranas de estetoscopios.

1. Crecimiento bacteriano en membranas de estetoscopios previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Gráfico 1: Crecimiento bacteriano en medio de cultivo previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C



Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

Gráfico 1: De las 66 membranas estudiadas, previo a la aplicación de luz ultravioleta-C, se observó crecimiento bacteriano en el 97% (N= 64) y un 3% (N= 2) restante sin presencia de contaminación. Posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C se cultivaron nuevamente, obteniendo un 78.8% (N= 52) de membranas descontaminadas y un 21.2% (N= 14) con crecimiento bacteriano.

Se evidenció una prevalencia de contaminación del 97% en las membranas analizadas previo a la aplicación de luz ultravioleta-C. Al comparar los resultados posterior a la

exposición a esta se observó una reducción de la contaminación a un 21.2% y un aumento de las membranas que no tuvieron crecimiento del 3% al 78.8%.

2. Pruebas de identificación bacteriana previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Para la identificación de las bacterias que crecieron en el medio PCA, se seleccionaron a las 48 horas de incubación, hasta 2 colonias de morfología diferente, las cuales se subcultivaron para obtener colonias puras. Se identificaron 88 bacterias, a los que se le realizaron pruebas respectivas para identificar como Gram positivas y Gram negativas.

Tabla 2: Bacterias identificadas previo a la aplicación de luz ultravioleta-C

Bacteria identificada	Frecuencia*	Pruebas de identificación	Resultado
S. coagulasa negativa	60 (68.2%)	Gram, catalasa, coagulasa	Cocos Gram positivos, catalasa positiva, coagulasa negativa
B. subtilis	19 (21.6%)	Gram, catalasa	Bacilos Gram positivos, catalasa positiva
MRSA	3 (3.4%)	Gram, catalasa, coagulasa, cultivo en medio cromogénico "Brilliance MRSA 2"	Cocos Gram positivos, catalasa positiva, coagulasa positiva, colonias azules en medio cromogénico
Streptococcus spp.	2 (2.3%)	Gram, catalasa	Cocos Gram positivos, catalasa negativa
P. aeruginosa	1 (1.1%)	Gram, prueba API 20E	Bacilos Gram negativos con biocódigo API 20E 2206047
Pseudomonas oryzihabitans	1 (1.1%)	Gram, prueba API 20E	Bacilos Gram negativos con biocódigo API 20E 0201000
Serratia fonticola	1 (1.1%)	Gram, prueba API 20E	Bacilos Gram negativos con biocódigo API 20E 0104773
Myrioides spp./ Chryseobacterium indologenes	1 (1.1%)	Gram, prueba API 20E	Bacilos Gram negativos con biocódigo API 20E 0210004
N= 88. * Medidas expresadas en número total (%)			

Tabla 2: Se reporta en orden descendente de prevalencia la cantidad de bacterias según especie y las pruebas microbiológicas con sus resultados respectivos. Fuente: datos obtenidos por equipo investigador.

Gráfico 2: Bacterias identificadas previo a la aplicación de luz ultravioleta-C

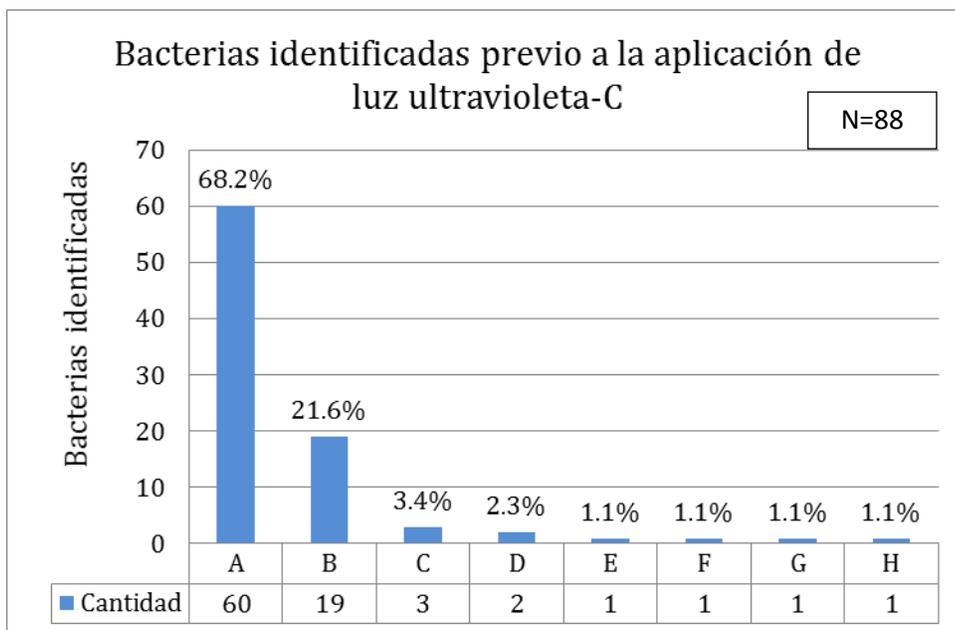


Gráfico 2: Bacterias identificadas previo a la aplicación de luz ultravioleta-C. A: *S. coagulasa* negativa, B: *B. subtilis*, C: MRSA, D: *Streptococcus spp.*, E: *P. aeruginosa*, F: *P. oryzihabitans* (*P. oryzihabitans*); 1.1% (N= 1) *Serratia fonticola* (*S. fonticola*); 1.1% (N= 1) *Myrioides spp./ Chryseobacterium indologenes* (*C. indologenes*).

Gráfico 2: 68.2% (N=60) de las bacterias identificadas fueron *S. coagulasa* negativa; 21.6% (N= 19) *B. subtilis*; 3.4% (N= 3) MRSA; 2.3% (N= 2) *Streptococcus spp.*; 1.1% (N= 1) *P. aeruginosa*; 1.1% (N= 1) *Pseudomonas oryzihabitans* (*P. oryzihabitans*); 1.1% (N= 1) *Serratia fonticola* (*S. fonticola*); 1.1% (N= 1) *Myrioides spp./ Chryseobacterium indologenes* (*C. indologenes*). Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

Para la identificación de las bacterias que crecieron en el medio PCA, posterior a la exposición a la luz ultravioleta-C, se subcultivaron las colonias encontradas. Todos los medios tuvieron el crecimiento de colonias de 1 morfología. Se identificaron 14 bacterias, a las cuales se les realizaron pruebas de identificación microbiológica.

Tabla 3: Bacterias identificadas posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.

Bacteria identificada	Frecuencia *	Pruebas de identificación	Resultado
S. coagulasa negativa	13 (92.9%)	Gram, catalasa, coagulasa	Cocos Gram positivos, catalasa positiva, coagulasa negativa
MRSA	1 (7.1%)	Gram, catalasa, coagulasa, cultivo en medio cromogénico "Brilliance MRSA 2"	Cocos Gram positivos, catalasa positiva, coagulasa positiva, colonias azules en medio cromogénico
N= 14. * Medidas expresadas en número total (%)			

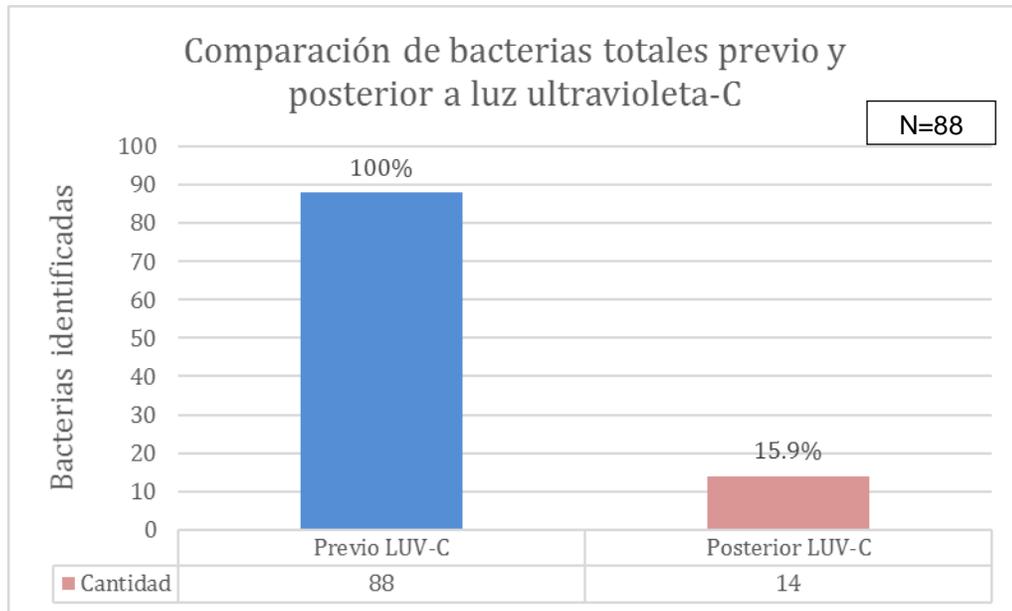
Tabla 3: Se reporta en orden descendente de prevalencia la cantidad de bacterias según especie y las pruebas microbiológicas con sus resultados respectivos. Fuente: datos obtenidos por equipo investigador.

3. Comparación de bacterias identificadas previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Previo a la aplicación de luz ultravioleta-C se identificaron 24 placas de Petri con 2 colonias de diferente morfología. Al realizar las pruebas de identificación se determinó que se trataba de 2 especies bacterianas distintas (N=48). Además, se identificaron 40 placas de Petri con colonias de una sola morfología (N=40). Resultando en un total de 88 cepas bacterianas aisladas.

Posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C se identificaron 14 placas de Petri con crecimiento de colonias bacterianas de una sola morfología.

Gráfico 3: Comparación de bacterias totales previo y posterior a aplicación de luz ultravioleta-C

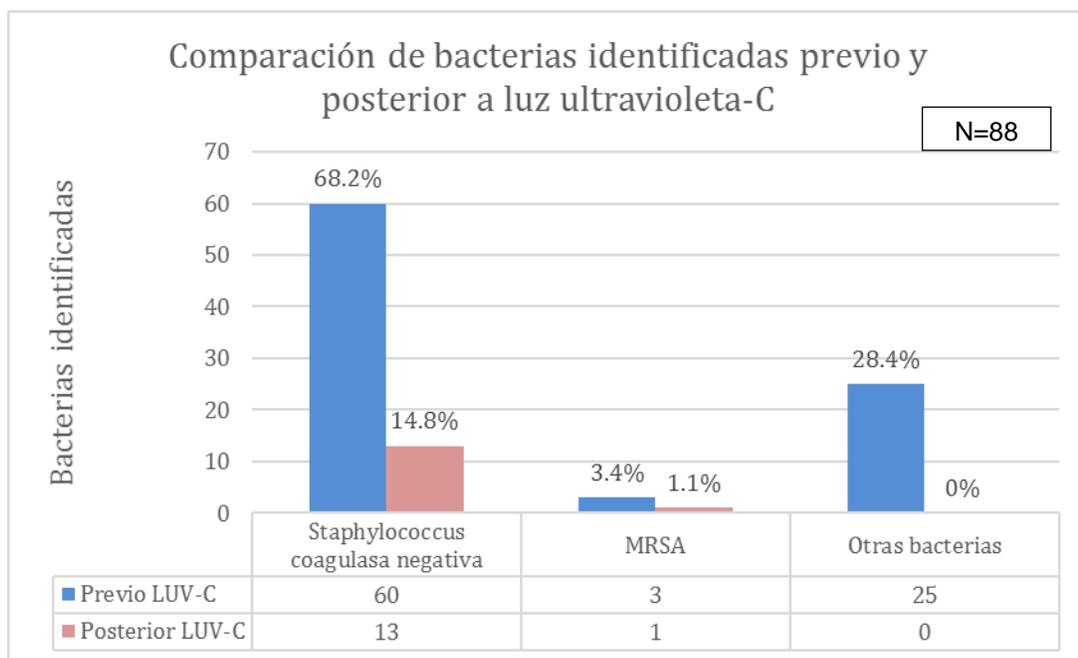


Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

Gráfico 3: Se observa el total de bacterias identificadas (N=88) previo a la exposición a la luz ultravioleta-C. Después de la exposición a esta solo se aisló el 15.9% (N=14).

El número de bacterias identificadas posterior a la exposición a la luz ultravioleta-C (N=14) tuvo una reducción importante, al ser comparado con las bacterias aisladas previo a su utilización (N=88).

Gráfico 4: Comparación de bacterias identificadas previo y posterior a aplicación de luz ultravioleta-C



Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

Gráfico 4: Previo a la aplicación de luz ultravioleta-C se observó un 68.2% (N=60) de bacterias *S. coagulasa negativa*; MRSA 3.4% (N=3) y otras bacterias 28.4% (N=25). Posterior a la exposición a luz ultravioleta-C se identificaron 14.8% (N=13) de bacterias *S. coagulasa negativa* y MRSA 1.1% (N=1).

Se evidenció una disminución de la contaminación de las membranas de estetoscopio con todas las especies identificadas inicialmente. Con una reducción de *S. coagulasa negativa* del 68.2% al 14.8%, MRSA del 3.4% al 1.1%, así como una eliminación completa de las demás bacterias aisladas (*B. subtilis*, *Streptococcus spp.* y bacterias Gram negativas).

4. Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

A las 64 membranas que presentaron crecimiento previo a la exposición de luz ultravioleta-C, se les realizó lectura del número de unidades formadoras de colonia en el placas de PCA, previa y posteriormente a la utilización de esta.

Unidades formadoras de colonia previo a la luz ultravioleta-C: el número mínimo fue 1 UFC, el máximo 250 UFC y el promedio 27.9 UFC.

Unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C: el número mínimo fue 0 UFC, el máximo 74 UFC y el promedio 1.5 UFC.

Gráfico 5: Unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias totales

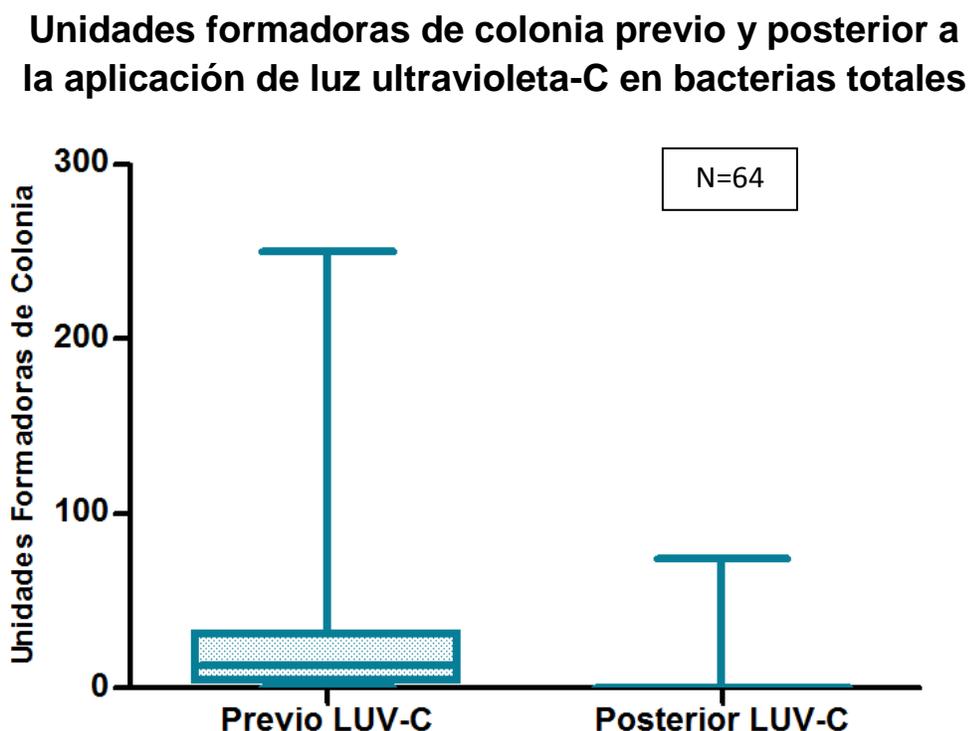


Gráfico 5: Se muestra la distribución de unidades formadoras de colonia en forma de mediana y rango intercuartílico [Cuartil1-Cuartil3]. Los resultados previo luz ultravioleta-C (LUV-C) fueron: 13 [4-31] y la distribución posterior LUV-C fue: 0 [0-0]. Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

5. Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram positivas

Las unidades formadoras de colonia encontradas en las placas de PCA previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en las 60 membranas con crecimiento de bacterias Gram positivas fueron:

Unidades formadoras de colonia previo a la luz ultravioleta-C: el número mínimo fue 1 UFC, el máximo 250 UFC y el promedio 28.2 UFC.

Unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C: el número mínimo fue 0 UFC, el máximo 74 UFC y el promedio 1.5 UFC.

Gráfico 6: Unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram positivas

Unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram positivas

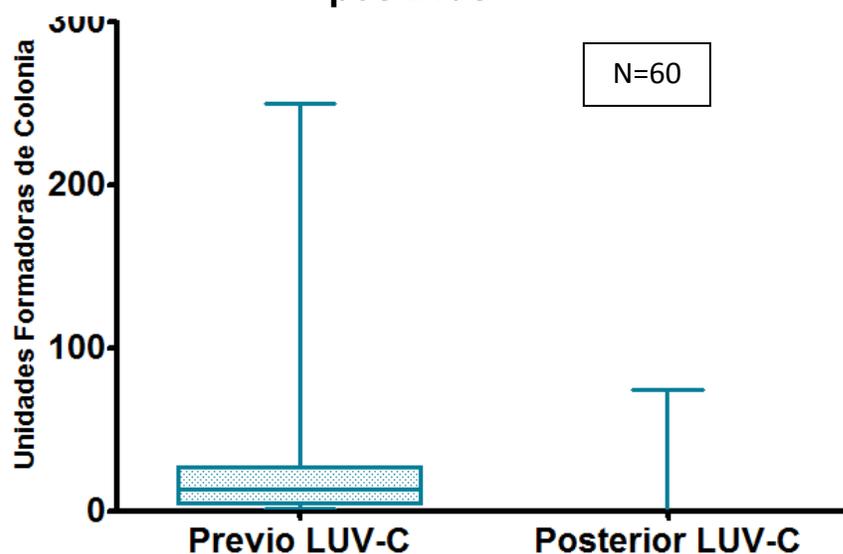


Gráfico 6: Se muestra la distribución de unidades formadoras de colonia en forma de mediana y rango intercuartílico [Cuartil1-Cuartil3]. Los resultados previo exposición a luz ultravioleta-C (LUV-C) fueron: 13 [4-27.3] y la distribución posterior a LUV-C fue: 0 [0-0]. Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

6. Determinación del número de unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram negativas

Las unidades formadoras de colonia encontradas en las placas de PCA previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en las 4 membranas con crecimiento de bacterias Gram negativas fueron:

Unidades formadoras de colonia previo a la luz ultravioleta-C: el número mínimo fue 4 UFC, el máximo 47 UFC y el promedio 24 UFC.

No hubo crecimiento bacteriano posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en los subcultivos de las bacterias Gram negativas.

Gráfico 7: Unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram negativas

Unidades formadoras de colonia previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en bacterias Gram negativas

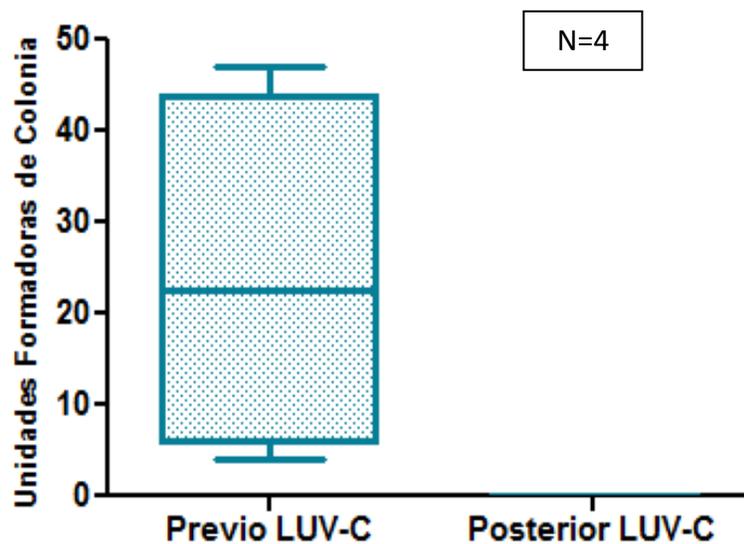


Gráfico 7: Se muestra la distribución de unidades formadoras de colonia en forma de mediana y rango intercuartílico [Cuartil1-Cuartil3]. Los resultados previo luz ultravioleta-C (LUV-C) fueron: 22.5 [5.8-43.8]. No hubo crecimiento posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C. Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

7. Porcentaje de eliminación bacteriana en membranas de estetoscopio posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

El porcentaje de eliminación bacteriana se realizó utilizando la siguiente fórmula: porcentaje de eliminación = $100\% - (100\% \times (\text{unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C} / \text{unidades formadoras de colonia previo a la aplicación de luz ultravioleta-C}))$. El porcentaje de eliminación promedio fue del 98%.

Tabla 4: Porcentaje de eliminación bacteriana en membranas de estetoscopio posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Bacterias encontradas en membrana	Porcentaje de reducción
S. coagulasa negativa	97.9
S. coagulasa negativa /B. subtilis	96.3
B. subtilis	100.0
MRSA/B. subtilis	93.8
MRSA/ S. coagulasa negativa	100.0
Myrioides spp/ C. indologenes/ S. coagulasa negativa	97.1
P. aeruginosa / S. coagulasa negativa	97.9
P. oryzihabitans/ S. coagulasa negativa	100.0
S. fonticola/ S. coagulasa negativa	100.0
Streptococcus spp.	100.0
S. coagulasa negativa / Streptococcus spp.	100.0
Promedio porcentaje de reducción	98.0

Tabla 4: Porcentaje de eliminación bacteriana en membranas de estetoscopio posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C. Estos datos fueron separados según las bacterias encontradas en las placas de PCA, agrupando las que tenían crecimiento de 1 ó 2 bacterias en la misma placa. Fuente: Datos obtenidos por equipo investigador.

8. Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias identificadas

Tabla 5: Análisis estadístico de crecimiento bacteriano previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Grupos de bacterias	N [†]	Unidades formadoras de colonia previo LUV-C*	Unidades formadoras de colonia posterior LUV-C*	Porcentaje de eliminación	Diferencia de medianas, p por test de Wilcoxon
Bacterias totales	64	13 [4-31], (1-250)	0 [0-0], (0-74)	98	-12.5 / p<0.0001
Bacterias Gram positivas	60	13 [4-27.3], (1-250)	0 [0-0], (0-74)	98	-12.5 / p<0.0001
Bacterias Gram negativas	4	22.5 [5.8-43.8], (4-47)	0	100	-22.5 / p=0.0625
† Frecuencia * Medidas expresadas en mediana [rango intercuartílico], (Mínimo - Máximo) de unidades formadoras de colonia					

Tabla 5: Se muestran las pruebas estadísticas de mediana, rango intercuartílico, valor máximo y mínimo, porcentaje de eliminación, diferencia de medianas y p de test de Wilcoxon, previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C en los grupos de bacterias totales, bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

La mediana y rango intercuartílico de unidades formadoras de colonia previo a la aplicación de luz ultravioleta-C para bacterias totales fue de 13 [4-31], para bacterias Gram positivas de 13 [4-27.3] y para bacterias Gram negativas de 22.5 [5.8-43.8]. La mediana y rango intercuartílico de unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C para bacterias totales fue de 0 [0-0], para bacterias Gram positivas de 0 [0-0] y no hubo crecimiento en bacterias Gram negativas. El porcentaje de reducción posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C para bacterias totales y Gram positivas fue de 98%, para bacterias Gram negativas fue de 100%.

La diferencia de medianas fue estadísticamente significativa en el grupo de bacterias totales (-12.5/ p <0.0001) y bacterias Gram positivas (-12.5/ p <0.0001), por lo que se evidencia que la luz ultravioleta-C es eficaz en la eliminación bacteriana de estos grupos al ser aplicada por 10 minutos. En el grupo de bacterias Gram negativas se produjo una eliminación del 100% del crecimiento bacteriano, de estas solo se analizaron 4 muestras por lo que no es posible demostrar una significancia estadística.

Tabla 6: Análisis estadístico de bacterias identificadas previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C

Bacterias identificadas	N†	Unidades formadoras de colonia previo LUV-C*	Unidades formadoras de colonia posterior LUV-C*	Porcentaje de eliminación	Diferencia de medianas / p por test de Wilcoxon
<i>S. coagulasa</i> negativa	37	8 [3-30], (1-250)	0 [0-0], (0-74)	97.9	-7/ p<0.0001
<i>S. coagulasa</i> negativa/ <i>B. subtilis</i>	16	24 [18.5-46.5], (4-114)	0 [0-1], (0-6)	96.3	-22.5/ p<0.0001
<i>B. subtilis</i>	2	13.5 [3-24], (3-24)	0	100	N/A
MRSA/ <i>S. coagulasa</i> negativa	2	4 [3-5], (3-5)	0	100	N/A
MRSA/ <i>B. subtilis</i>	1	16	1	93.8	N/A
<i>Myrioides spp/ C. indologenes/ S. coagulasa</i> negativa	1	34	1	97.1	N/A
<i>P. aeruginosa / S. coagulasa</i> negativa	1	47	1	97.9	N/A
<i>P. oryzihabitans/ S. coagulasa</i> negativa	1	11	0	100.0	N/A
<i>S. fonticola/ S. coagulasa</i> negativa	1	4	0	100	N/A
<i>Streptococcus spp.</i>	1	4	0	100	N/A
<i>S. coagulasa</i> negativa/ <i>Streptococcus spp.</i>	1	21	0	100	N/A
† Frecuencia * Medidas expresadas en mediana [rango intercuartílico], (Mínimo - Máximo) de unidades formadoras de colonia					

Tabla 6: Se muestran las bacterias identificadas en los medios de cultivo, con 1 ó 2 especies por Placa de Petri y sus pruebas estadísticas respectivas de mediana, rango intercuartílico, valor máximo y mínimo, porcentaje de eliminación, diferencia de medias y p de test de Wilcoxon, previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.

La mediana y rango intercuartílico de unidades formadoras de colonia previo a la aplicación de luz ultravioleta-C para la bacteria *S. coagulasa* negativa fue de 8 [3-30], para *S. coagulasa* negativa /*B. subtilis* de 24 [18.5-46.5], para *B. subtilis* de 13.5 [3-24] y para MRSA/ *S. coagulasa* negativa de 4 [3-5]. La mediana y rango intercuartílico de unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C para *S. coagulasa* negativa fue de 0 [0-0] para *S. coagulasa* negativa /*B. subtilis* de 0 [0-0]. No hubo crecimiento posterior para las bacterias de *B. subtilis* y MRSA/ *S. coagulasa* negativa.

Los medios de cultivo restantes solo fueron identificados en una ocasión, con la lectura de unidades formadoras de colonia para MRSA/*B. subtilis* de 16, *Myrioides spp/Chryseobacterium indologenes/ S. coagulasa* negativa de 34, *Pseudomona aeruginosa/ S. coagulasa* negativa de 47, *Pseudomona oryzihabitans/ S. coagulasa* negativa de 11, *Serratia fonticola/ S. coagulasa* negativa de 4, *Streptococcus spp* de 4 y para *S. coagulasa* negativa /*Streptococcus spp* de 21.

La diferencia de medias fue estadísticamente significativa para *S. coagulasa* negativa (-7/ $p < 0.0001$) y para *S. coagulasa* negativa /*B. subtilis* (-22.5/ $p < 0.0001$), demostrando que la aplicación de luz ultravioleta-C por 10 minutos es eficaz en la reducción del crecimiento bacteriano en estos grupos.

No se pudieron realizar las pruebas de diferencia de medianas para los grupos restantes, debido a que la muestra fue insuficiente. Sin embargo, se evidencia una reducción importante en el número de unidades formadoras de colonia posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C.

9. Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de MRSA, *E. coli* y *P. aeruginosa*

El número de muestras encontradas de MRSA y *P. aeruginosa* fue insuficiente para poder realizar las pruebas estadísticas, solo se determinó el porcentaje de reducción de 96.9% y 100% respectivamente (Tabla 4). No se aisló ninguna *E. coli* en las membranas de los estetoscopios analizados.

Discusión

La prevalencia de contaminación encontrada en las membranas de estetoscopio de los estudiantes de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado fue del 97%. Este porcentaje de contaminación difiere al reportado en un estudio realizado en África del 78.5%, esto pudo estar determinado porque solo se analizaron membranas de estetoscopios de médicos graduados y personal de salud y no se utilizaron membranas de estudiantes.¹²

Se evidenció que la luz ultravioleta-C aplicada por 10 minutos fue capaz de producir una reducción en el número de membranas de estetoscopio contaminadas del 97% al 21.2%, con un aumento en el porcentaje de membranas que no presentaron crecimiento bacteriano del 3% al 78.8%. Esta disminución en la cantidad de superficies contaminadas es superior a la reportada en un estudio en el que se evaluó la aplicación de luz ultravioleta-C sobre superficies de cuartos hospitalarios. En este estudio se encontró una prevalencia inicial similar del 98.4%, con una reducción al 88.9% posterior a su aplicación. No se especificó el tiempo de exposición de luz ultravioleta-C en este estudio.¹¹⁴

Las bacterias identificadas en el estudio realizado difieren de manera significativa a las reportadas en la literatura previa, tanto en las especies como su distribución y porcentaje encontrado (Gráfico 2). La diferencia más marcada presente en esta investigación es la alta prevalencia de *S. coagulasa* negativa, bacteria que representa el 68.2% de la contaminación de las membranas, así como de *B. subtilis* con 22.6%. Estas bacterias no fueron reportadas en múltiples estudios pese a que constituyen microorganismos presentes en la flora de la piel y los más frecuentemente aislados en superficies.¹¹⁵

Con respecto a las bacterias Gram negativas, estas representan un grupo pequeño de los microorganismos aislados constituyendo un 4.5% de las 88 bacterias identificadas, *P. aeruginosa* tuvo 1.1% y no se aisló ninguna *E. coli*. En otros estudios se ha reportado un porcentaje de hasta 46% para bacterias Gram negativas.^{12,31}

El 21.2% (N=14) de contaminación de las membranas de estetoscopio posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C correspondió a 13 muestras en las que se aisló *S. coagulasa* negativa y 1 MRSA. Las demás bacterias identificadas previamente no tuvieron crecimiento posterior a la descontaminación de las membranas. Se evidenció una reducción del 68.2% al 14.8% para *S. coagulasa* negativa y 3.4% al 1.1% para MRSA. A la fecha no se encontraron estudios con diseño metodológico similar con los que se puedan comparar estos resultados.

La cantidad de contaminación encontrada en las placas inoculadas de PCA reportadas como unidades formadoras de colonia fue inferior a la descrita por estudios previos, en este estudio se encontraron 2 membranas sin crecimiento bacteriano y un promedio de

unidades formadoras de colonia de 27.9, en contraste con otras investigaciones que reportan crecimiento bacteriano hasta de 100% de las membranas y un promedio de unidades formadoras de colonia de 89. Estas diferencias probablemente se asocian a variaciones del diseño metodológico ya que en los estudios previos utilizaron membranas de estetoscopio posterior a un examen físico estandarizado en pacientes ingresados con infecciones activas. Además, se utilizó un medio de cultivo de otra marca y no se especificó el tiempo de contacto de las membranas sobre las placas de Petri utilizadas.¹¹

La luz ultravioleta-C aplicada por 10 minutos sobre las membranas de estetoscopio fue eficaz en la reducción de crecimiento bacteriano, esta disminución fue estadísticamente significativa al determinar la diferencia de medianas de los grupos de bacterias totales (-12.5/ $p < 0.0001$), bacterias Gram positivas (-12.5/ $p < 0.0001$), *S. coagulasa* negativa (-7/ $p < 0.0001$) y *S. coagulasa* negativa /*B. subtilis* (-22.5/ $p < 0.0001$). Esto concuerda con los resultados obtenidos en diversos estudios previos que reportan un porcentaje de eliminación del 99.6% al ser utilizada por 10 minutos, además de pruebas estadísticas con resultados similares. Debido a que solo se analizaron 4 muestras de bacterias Gram negativas, con una eliminación del 100%, no se pudo comprobar la significancia estadística de este resultado.^{10,29,31}

En el estudio se encontró una reducción del 100% para el crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis*, este resultado es importante ya que demuestra la eficacia de la luz ultravioleta-C para la eliminación de microorganismos esporulado, los cuales presentan cierto porcentaje de resistencia a esta. Un estudio que evaluó la exposición de luz ultravioleta-C, a una longitud de onda de 254nm sobre esporas de *Bacillus subtilis* demostró, reducción del 85% en el crecimiento bacteriano.¹¹⁶

La eliminación de MRSA a través de la luz ultravioleta-C no pudo ser evaluada con pruebas que determinarán la significancia estadística, debido a la baja cantidad de bacterias aisladas de esta especie. Solo se puede concluir que la luz ultravioleta-C fue capaz de eliminar en un 96.9% el crecimiento bacteriano de esta. Este porcentaje resultó ser mayor al reportado en estudios previos (87.5%). Sin embargo, el diseño metodológico utilizado fue distinto, con el uso de un dispositivo fabricado por los investigadores y una exposición a la luz ultravioleta-C por una duración menor (1 minuto).¹¹⁷

En el estudio realizado no se aisló ninguna *E. coli* en las membranas de los estetoscopios por lo que no se puede afirmar ni negar la hipótesis de investigación. Este resultado difiere significativamente con el encontrado en estudios que analizaron la prevalencia en estetoscopios en personal de salud, en el cual se encontró un 13.1% de membranas contaminadas con *E. coli*. No obstante, en estudios que evaluaron la contaminación de superficies en el ambiente hospitalario, particularmente en teclados de computadoras, no se aislaron cepas de *E. coli*. Se considera importante corroborar

la prevalencia de *E. coli* en diferentes dispositivos y superficies medicas en estudios subsecuentes, realizados en El Salvador.^{12,31}

La eliminación de *P. aeruginosa* a través de la luz ultravioleta-C no pudo ser evaluada con pruebas que determinarán la significancia estadística, esto debido a que solo se aisló una bacteria de esta especie. Solo se puede concluir que la luz ultravioleta-C fue capaz de eliminar en un 100% el crecimiento bacteriano de esta. Este porcentaje de reducción fue mayor al encontrado en estudios previos (94.9%). El diseño metodológico utilizado en el estudio de comparación fue diferente, con el uso de un dispositivo diseñado por los investigadores y una exposición a luz ultravioleta-C por una duración menor (1 minuto).¹¹⁷

La poca prevalencia de bacterias involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria, elegidas previamente al desarrollar el estudio (MRSA, *E. coli* y *P. aeruginosa*), es en sí un resultado importante que muestra las diferencias de las poblaciones bacterianas que predominan en determinados hospitales, que influyen en el impacto de las infecciones asociada a la atención sanitaria, reduciendo el riesgo para los pacientes y el personal de salud que se encuentran en contacto con estos dispositivos medicos.^{12,31}

Uno de los resultados inesperados en el estudio fue la alta prevalencia de *S. coagulasa* negativa (68.2%), ya que ninguna de las investigaciones revisadas previamente, que evaluaron la prevalencia de bacterias en superficies del ambiente hospitalario, reportaron la presencia de este grupo. En los últimos años especies de este grupo se han convertido en patógenos importantes en la atención sanitaria, por ejemplo, el *Staphylococcus epidermidis*, previamente reportado como un microorganismo comensal inocuo de la piel, ha sido catalogado como la causa más frecuente de infecciones hospitalarias asociadas a dispositivos permanentes como catéteres venosos y urinarios. Este presenta mecanismos de producción de biofilms, con exopolímeros protectores ante la respuesta inmune, así como, resistencia a antibióticos como: metilina (75-90%), rifampicina, fluoroquinolonas, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina y sulfonamidas. Se recomienda ampliar el resultado obtenido en el estudio y buscar si la población atendida por los estudiantes de medicina posee infecciones o complicaciones asociadas a este microorganismo.^{118,119}

Conclusiones

Se mostró una prevalencia de contaminación de estetoscopios de 97% en la población de estudiantes de medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado, habiéndose aislado: *S. coagulasa* negativa en 68.2% de las muestras; *B. subtilis* en 21.6%; MRSA en 3.4%; *Streptococcus spp.* en 2.3%; *P. aeruginosa* en 1.1%; *P. oryzihabitans* en 1.1%; *S. fonticola* en 1.1% y *Myrioides spp./ C. indologenes* 1.1%.

Se determinó que la exposición a luz ultravioleta-C por 10 minutos sobre las membranas de estetoscopios redujo en un 98% el crecimiento bacteriano, con una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados previos y posteriores a su aplicación ($p < 0.0001$), por lo que se puede concluir que este procedimiento fue eficaz para la eliminación de bacterias involucradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria, presentes en las membranas de los estetoscopios de los estudiantes de medicina del área clínica de la Universidad Dr. José Matías Delgado, cumpliendo el objetivo general del estudio.

La luz ultravioleta-C fue eficaz para eliminación de bacterias Gram positivas, demostrando una diferencia estadísticamente significativa, en resultados de cultivos previa y posterior a su aplicación ($p < 0.0001$).

La luz ultravioleta-C provocó una reducción del 100% en el número de colonias de las bacterias Gram negativas. No se pudo establecer una diferencia estadísticamente significativa a través de las pruebas analíticas, debido al número limitado de muestras.

El crecimiento bacteriano presentado por las cepas de MRSA aisladas en el estudio, fue reducido en un 96.9% posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C. No se pudo demostrar a través de pruebas de significancia estadística la eficacia de la luz ultravioleta-C para la eliminación de MRSA, debido a una cantidad inferior a la necesaria para llevar a cabo esta prueba.

No se aislaron cepas de *E. coli* en las membranas de estetoscopios de los estudiantes, razón por la cual no se pudo determinar el porcentaje de reducción de crecimiento bacteriano y su significancia estadística al utilizar luz ultravioleta-C.

El crecimiento bacteriano presentado por las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en el estudio, fue reducido en un 100% posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C. No se pudo demostrar a través de pruebas de significancia estadística la eficacia de la luz ultravioleta-C para la eliminación de *P. aeruginosa*, debido a una cantidad inferior a la necesaria para llevar a cabo esta prueba.

Los resultados de este trabajo muestran la eficacia de un método que puede contribuir al control de las infecciones asociadas a la atención sanitaria en El Salvador, mediante su aplicación en dispositivos que se ponen en contacto con el paciente y que pueden ser portadores de microorganismos patógenos.

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones encontradas en el estudio fueron:

1. Poca colaboración y participación por parte de los estudiantes de medicina: a pesar de que se realizaron múltiples avisos, se realizaron charlas educativas acerca de la importancia de este estudio, se coordinó con los representantes de año y se extendió el período de la toma de la muestra para estudiantes que no portaban su estetoscopio el día acordado, muchos de estos manifestaron no tener interés en participar.
2. Una distribución en la prevalencia de especies de bacterias diferente a la reportada en estudios previos: se encontraron especies de bacterias significativamente diferentes a las esperadas en estudios previos, además el porcentaje de estas fue distinto. Con una baja cantidad de contaminación por MRSA, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
3. Materiales y recursos económicos disponibles para el equipo investigador: los autores del estudio contaron con un presupuesto limitado y materiales donados por la Universidad Dr. José Matías Delgado, razón por la cual no se realizaron pruebas adicionales para determinar la identidad de especies de *S. coagulasa* negativa y *Streptococcus spp.*

Recomendaciones

Se recomienda promover nuevas investigaciones que continúen los resultados obtenidos en este estudio, basándose en la prevalencia de contaminación encontrada, expandiéndose a áreas como los métodos de limpieza y descontaminación que utilizan los estudiantes para sus instrumentos, las bacterias presentes en médicos graduados y las implicaciones clínicas de la presencia de las bacterias aisladas en los pacientes del Hospital San Rafael y otras áreas de práctica.

Se considera importante realizar nuevas mediciones en los estudiantes que no participaron en el estudio, brindando educación acerca de la importancia de su involucramiento. Los autores de este estudio valoraron realizar más tomas de muestra, sin embargo, por razones económicas y de tiempo estas no fueron factibles.

Se sugiere la limpieza y descontaminación periódica de todo instrumento médico utilizado en pacientes, para lo cual se pueden emplear los métodos usuales descritos anteriormente como alcohol etílico o isopropílico al 70-90 % y jabones, así como, dispositivos emisores de luz ultravioleta de uso personal, como el utilizado en el estudio (PhoneSoap 3.0). También se recomienda hacer un énfasis en la importancia del correcto lavado de manos para la prevención de infecciones en los proveedores de salud y pacientes.

Anexos

Anexo 1: Procedimiento de tinción de Gram⁷²

1. Colocar sobre el portaobjetos una gota de agua, con un aplicador estéril colocar sobre esta la muestra del cultivo bacteriano.
2. Formar una película homogénea sobre el portaobjetos utilizando el aplicador estéril, dejar secar.
3. Fijar la muestra en el portaobjetos con la llama de un mechero.
4. Colocar colorante cristal violeta, dejar reposar durante 1 minuto.
5. Lavar el exceso del colorante con agua.
6. Cubrir con solución de Lugol, dejar reposar durante 1 minuto.
7. Lavar el exceso del colorante con agua.
8. Lavar con mezcla alcohol-acetona por 30 segundos, el tiempo debe ser estrictamente medido ya que este es un paso crítico para la decoloración y diferenciación de los resultados.
9. Lavar con abundante agua.
10. Colocar colorante de safranina, dejar de reposar por 1 minuto.
11. Lavar el exceso del colorante con agua.
12. Secar al aire libre.
13. Para la visualización en microscopio añadir 1 gota de aceite de inmersión.

Anexo 2: Procedimiento del test de catalasa⁷⁵

1. Colocar una gota de H_2O_2 al 3% sobre un portaobjetos.
2. Con el aplicador estéril tomar una muestra de la colonia que se desea estudiar y mezclarla con el H_2O_2 .
3. Esperar 10 segundos para realizar la lectura.
4. Se considera que la prueba es positiva cuando existe la producción de burbujas.

Anexo 3: Procedimiento de test de coagulasa⁷⁶

1. Colocar en un tubo de ensayo estéril las muestras de la colonia.
2. Agregar con la pipeta estéril 0.5 ml de plasma citratado de conejo en el tubo de ensayo.
3. Colocar a temperatura de 35° C y evaluar la formación de un coágulo a las 4 horas.
4. En caso de ser una lectura negativa se procederá a la lectura 18 horas posteriores.
5. Se considera positiva en caso de observarse coágulo en cualquiera de las dos evaluaciones.

Anexo 4 Procedimiento para la realización del sistema API 20E^{81,82}

1. Preparar una suspensión con la muestra de colonia bacteriana colocándola en un tubo de ensayo estéril con 5 mL de solución buffer o solución salina, la muestra debe ser aplicada en la base del tubo, realizando un movimiento de rotación con el aplicador.
2. Rotular el tubo de ensayo y la tira de API 20E a utilizar.
3. Con una pipeta estéril de Pasteur llenar los pocillos hasta la zona de cubierta, a excepción de las pruebas CIT, VP y GEL en los que se deberá llenar además la zona de cúpula. Evitar dejar burbujas en la porción inferior de los pocillos.
4. Llenar con parafina la zona de cúpula de las pruebas ADH, LDC, ODC, URE y H₂S.
5. Añadir 5mL de agua estéril en los alveolos de la bandeja de tira para proporcionar un ambiente húmedo.
6. Cubrir la bandeja de la tira con la tapa de plástico e incubar a 37°C durante 18-24 horas. Si la tira no puede ser leída después de 24 horas esta debe de ser removida de la incubadora y refrigeradas hasta que se pueda realizar la lectura.
7. Realizar la lectura de las pruebas que no requieren reactivos, observando el color y catalogándolas como positivas o negativas en la cartilla de resultados.
8. Si 3 o más test resultan positivos proceder con las pruebas que necesitan reactivos (TDA, VP e IND).
9. Si menos de 3 pruebas resultan positivas se debe de incubar tira por 24 horas extra y repetir el paso 8.
10. Asignar el puntaje a cada prueba sea negativa (0 puntos) o positiva (1,2 o 4 puntos) utilizando los parámetros para cada una de ellas. Realizar la sumatoria de puntos agrupados en tríos para formar un número de 7 dígitos.
11. Comparar el número resultante con la tabla de identificación de forma manual o con la ayuda de un software diseñado para esto.

Anexo 5: Resultado de pruebas bioquímicas API 20E^{80,81}

Nombre	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoína (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	citocromo oxidasa	Violeta-Violeta azulado	Incoloro o Rosa

Anexo 6: Hoja informativa para el participante (anverso)



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO

Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Posgrados

Hoja informativa estudio: “Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina”

Con la participación de los médicos en año social: Ana Lorena Aquino Obando, Salvador Alejandro Caceros Díaz y Carlos Eduardo Escobar Magaña. Con la asesoría de la Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio Menjívar.

Objetivo del estudio:

El estudio consistirá en determinar cuáles son las bacterias que se encuentran en las membranas de estetoscopios de estudiantes de medicina que cursen materias del área clínica, dando prioridad a las involucradas en infecciones asociadas a la atención sanitaria (*Staphylococcus aureus resistente a meticilina*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), para luego determinar la eficacia de un dispositivo comercial de venta libre que emite luz ultravioleta-C para eliminar estos microorganismos. La importancia de este tipo de investigación en determinar la capacidad que tiene el personal de salud y sus instrumentos para ser fuente de transmisión de patógenos relacionados en infecciones con un alto costo para el sistema de salud y aportar una opción accesible que demuestre ser eficaz para prevenir esta problemática.

Recolección de la muestra:

Posterior a finalizar su examen cada estudiante interesado en participar será dirigido a un aula cercana en la que se le explicara de forma individual la dinámica del estudio, aclarando cualquier duda y en caso de desear participar se pedirá llenar un consentimiento informado, las membranas serán introducidas en bolsas plásticas estériles identificadas con un sistema de codificación, este código almacenado en una base de datos, entregando una copia al estudiante para la devolución de la membrana

en un plazo máximo de 3 días hábiles. Las membranas se trasladarán al laboratorio de medicina de la FACSALEV en donde se realizarán las pruebas.

Anexo 6: Hoja informativa para el participante (reverso)

Procedimientos a realizar en el laboratorio de la FACSALEV:

El análisis consistirá en la toma de cultivo previo y posterior a la aplicación de 10 minutos de luz ultravioleta-C a través de un dispositivo conocido como PhoneSoap 3.0, para luego realizar pruebas de almacenamiento e identificación bacteriana: Tripticasa Soya Agar, Plate Count Agar, Agar Cromogénico, Tinción de Gram, Test de Coagulasa, Test de Catalasa y API 20E.

Entrega de las membranas de estetoscopios:

Al participar en el estudio se solicitará nombre completo, número de contacto y correo electrónico, datos con los cuales se coordinará la entrega de la membrana. El equipo investigador se compromete a devolver las membranas en un lapso de 3 días hábiles. Dentro de los daños teóricos que podrían ocurrir con las membranas se encuentra el extravío, daño por manipulación inadecuada y malfuncionamiento del aparato, ante tales situaciones el equipo es responsable de reponer de manera total la membrana.

Entrega de resultados:

A cada participante se le entregará el resultado del crecimiento bacteriano previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C con las recomendaciones según sea el caso.

Correo de contacto:

ultravioletacluz@gmail.com

Anexo 7: Formulario del consentimiento informado



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO

Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Posgrados

Universidad Dr. José Matías Delgado, Antiguo Cuscatlán, La Libertad. Fecha: _____

Yo _____, con número de carnet _____, en pleno uso de mis facultades, de manera libre y voluntaria, manifiesto que he sido informado acerca del estudio “Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociada a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina.” Se me ha detallado, cual es la metodología que se llevará acabo con la membrana de mi estetoscopio y cuáles son los posibles riesgos durante su manipulación. Estoy consciente de lo siguiente:

1. La membrana del estetoscopio solo se utilizará para inocular en medio de cultivo Plate Count Agar y será expuesta a 10 minutos de luz ultravioleta-C emitida por el dispositivo Phone Soap versión 3.0.
2. La membrana del estetoscopio será identificada, con un código correlativo, del cual tendré una copia.
3. Todos los procedimientos realizados a la membrana serán realizados con técnicas de asepsia y antisepsia adecuadas.
4. Existe el riesgo de daño e incluso la pérdida de la membrana, los cuales están relacionados al error humano y a la falla de manipulación de estas. En tal caso, el equipo investigador se hará responsable de la reposición de la membrana.
5. El equipo investigador no se hará responsable, por algún daño a la membrana previo a la realización del estudio.
6. La membrana de mi estetoscopio será devuelta en un plazo máximo de 3 días en un área previamente acordada.
7. Se me entregará el resultado del crecimiento o no bacteriano en la membrana y será mi responsabilidad tomar las medidas y recomendaciones para la descontaminación de estas.

Tomando todo esto en cuenta, acepto participar en el estudio.

Firma: _____

Código: _____

Anexo 8: Traslado de membranas al laboratorio de medicina UJMD

Imagen 5: Recolección de membranas en bolsas estériles

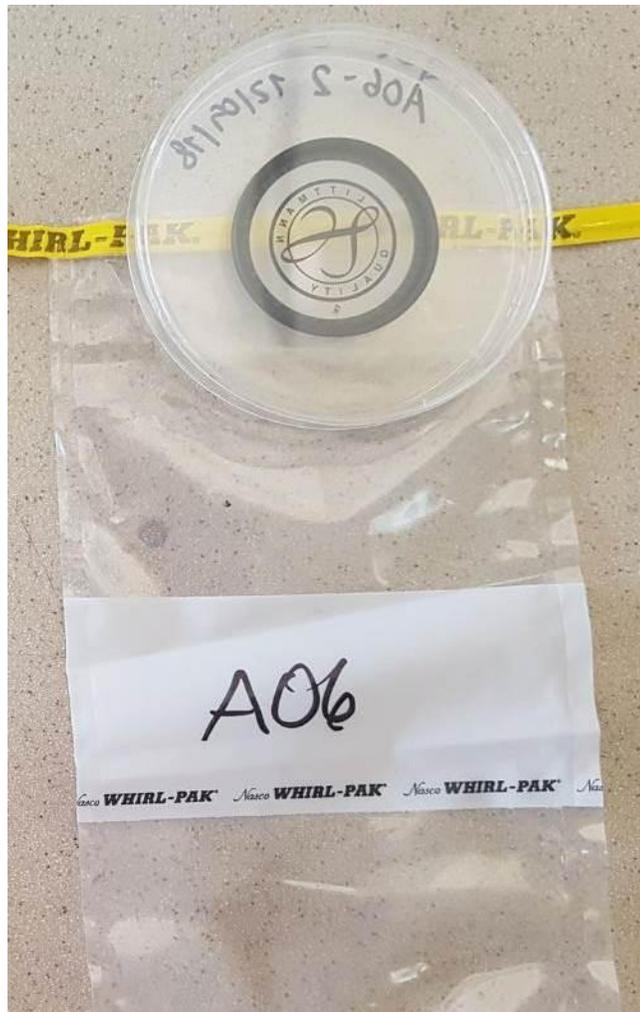


Se observan membranas de los estetoscopios de los estudiantes almacenadas en bolsas estériles, previamente identificadas con el número correlativo correspondiente.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Anexo 9: Inoculación en medios de cultivo PCA

Imagen 6: Inoculación en medios de cultivo PCA

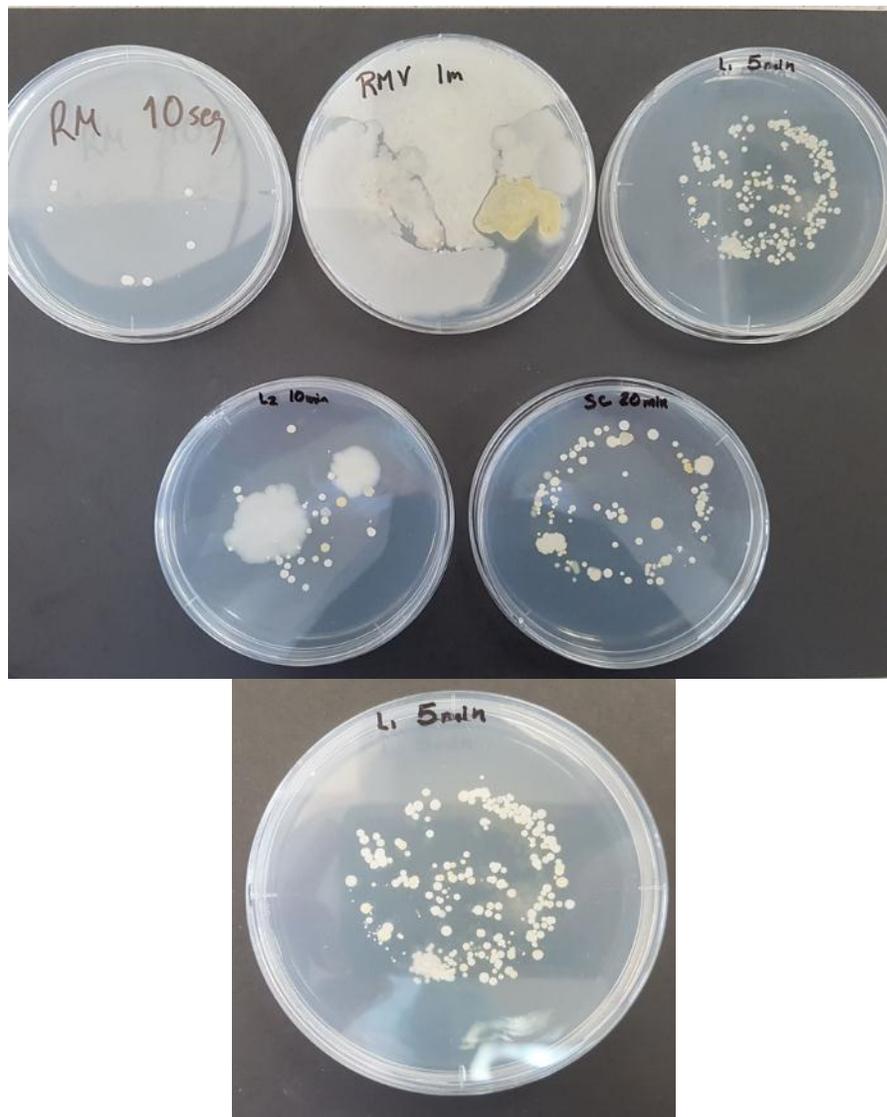


Se observa la exposición de membrana A06 al medio de cultivo PCA, posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C. Bolsa estéril y placa de Petri fueron rotuladas con el código correlativo.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Anexo 10: Prueba preliminar según tiempo en medios de cultivo PCA

Imagen 7: Prueba preliminar en medios de cultivo Plate Count Agar



Se observa el crecimiento bacteriano en medio PCA posterior a la exposición de la membrana en diferentes tiempos (10 segundos, 1, 5 10 y 20 minutos) y su incubación a 35°C por 24 horas. Se seleccionó un tiempo de exposición de 5 minutos.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Anexo 11: Lectura de unidades formadoras de colonia



Imagen 8

Se muestra el crecimiento bacteriano de la membrana B01 previo a la utilización de luz ultravioleta-C con más de 250 Unidades Formadoras de colonia.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador



Imagen 9

Se muestra el crecimiento bacteriano de la membrana A21 previo a la utilización de luz ultravioleta-C con 33 Unidades Formadoras de colonia.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

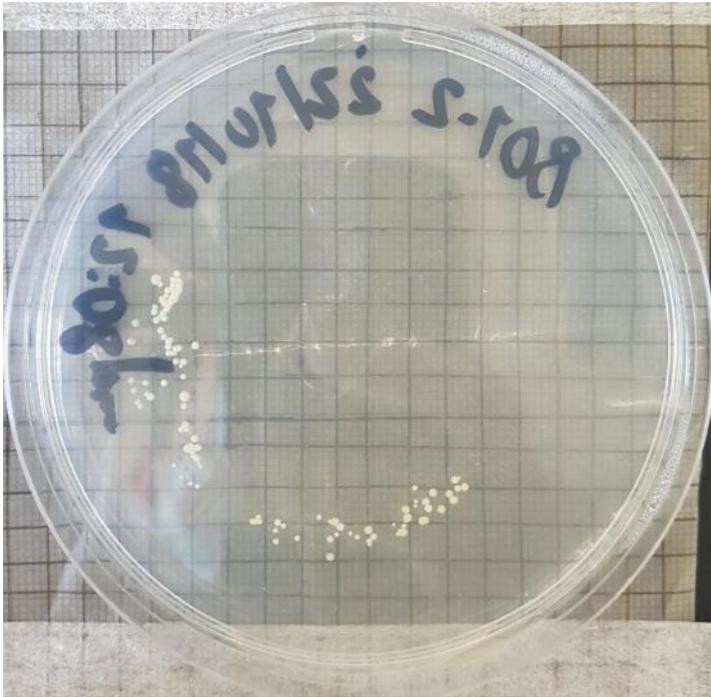


Imagen 10

Se muestra el crecimiento bacteriano de la membrana B01 posterior a la utilización de luz ultravioleta-C con 74 Unidades Formadoras de colonia.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

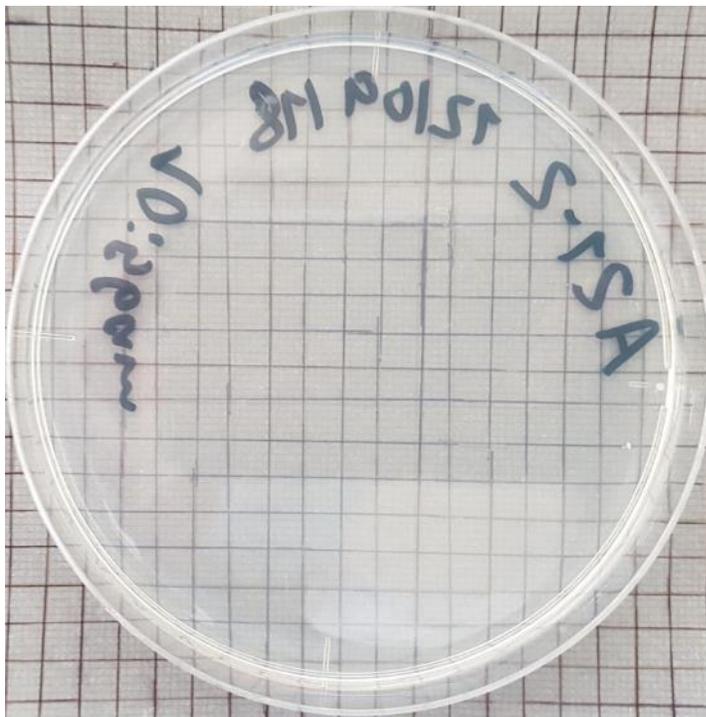


Imagen 11

Se muestra el resultado del cultivo de la membrana A21 posterior a la utilización de luz ultravioleta-C no hubo crecimiento bacteriano.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Anexo 12: Pruebas de identificación microbiológica



Imagen 12

Subcultivo puro de *S. coagulasa* negativa.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

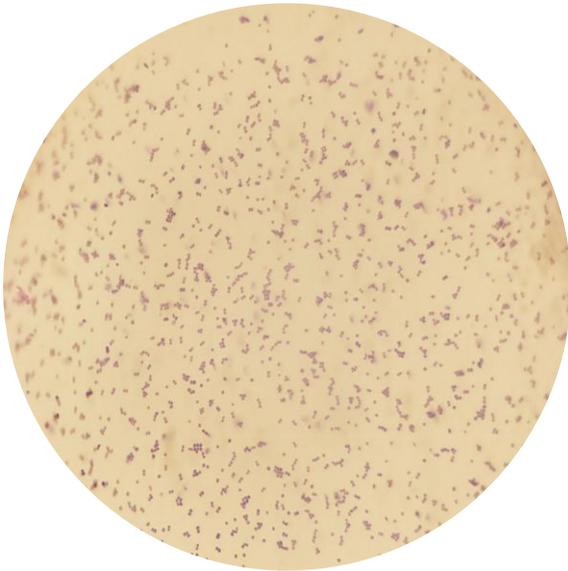
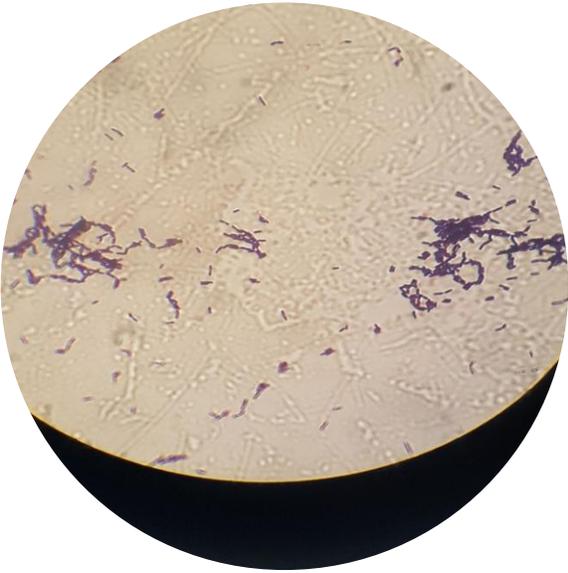


Imagen 13

Tinción de Gram de cocos Gram positivos.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Imagen 14

Tinción de Gram de bacilos Gram positivos.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

a de S.

ida por

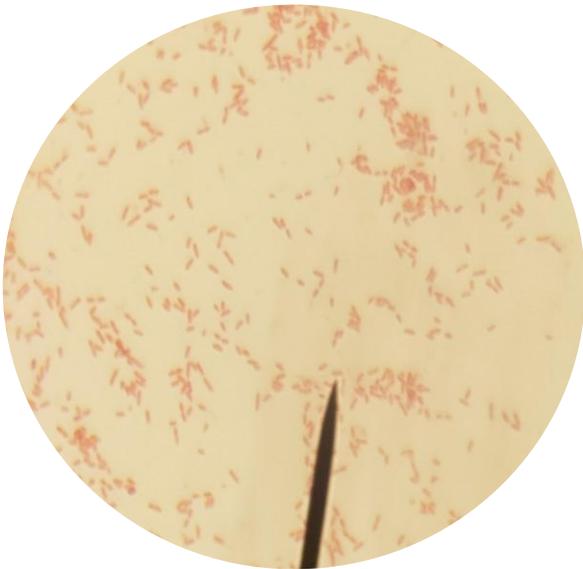


Imagen 15

Tinción de Gram de bacilos Gram negativos.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

positiva de

r



Imagen 18

Agar cromogénico “Brilliance MRSA 2” con crecimiento de MRSA.

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador



Imagen 19

Agar cromogénico “Brilliance MRSA 2” con crecimiento de MRSA para 2 cepas (superior e inferior derecha) y control negativo de *S. coagulasa* negativa (inferior izquierda).

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador



Imagen 20

Agar MacConkey con crecimiento de *Serratia fonticola* y su respectivo resultado de API 20E

Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador

Anexo 13: Resultados y recomendaciones al estudiante (anverso)



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Posgrados

Resultado crecimiento bacteriano de membrana de estetoscopio Código: _____ Fecha: _____

Medio de cultivo utilizado: Plate Count Agar

Resultado previo a la exposición de luz ultravioleta-C:

Crecimiento bacteriano Si No

Bacteria aislada: _____

Resultado posterior a la luz ultravioleta-C

Crecimiento bacteriano Si No

Bacteria aislada: _____

Nombre del responsable:

Firma:



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Posgrados

Resultado crecimiento bacteriano de membrana de estetoscopio Código: _____ Fecha: _____

Medio de cultivo utilizado: Plate Count Agar

Resultado previo a la exposición de luz ultravioleta-C:

Crecimiento bacteriano Si No

Bacteria aislada: _____

Resultado posterior a la luz ultravioleta-C

Crecimiento bacteriano Si No

Bacteria aislada: _____

Nombre del responsable:

Firma:

Anexo 13: Resultados y recomendaciones al estudiante (reverso)

Recomendaciones (No hubo crecimiento bacteriano posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C):

1. Continuar utilizando el método de descontaminación de su preferencia, ej.: alcohol etílico o isopropílico al 70-90%, uso de jabones, etc.
2. Aplicarlo previo y posterior a la utilización del estetoscopio y otros instrumentos de evaluación médica.
3. Guardar los instrumentos médicos en un medio limpio, como por ejemplo un estuche cerrado, en el que no se encuentre otros materiales que pudiesen estar contaminados.
4. Realizar el debido lavado de manos al manipular muestras bioinfecciosas, previo y posterior a la evaluación del paciente, al finalizar la jornada práctica y posterior al utilizar el servicio sanitario.

Recomendaciones (Hubo crecimiento de bacteria con potencial infeccioso posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C):

Utilizar los lineamientos “Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities” del Center for Disease Control and Prevention disponible en: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/tables/table1.html>

Se recomienda llevar a cabo los métodos sugeridos para superficies de instrumentos médicos tomando en cuenta el material de la membrana y accesibilidad a estos dentro de los métodos se encuentran:

1. Exposición de la membrana con alcohol etílico o isopropílico al 70-90 % por un tiempo mayor o igual a 1 minuto.
2. Hipoclorito de sodio preparado con lejía al 5.25-6.15% diluida al 1:500 con agua estéril.
3. Peróxido de hidrógeno al 7.5%, tomando en cuenta que este es capaz de corroer zinc, cobre, latón.

4. Cualquiera de los otros medios más especializados con glutaraldehído, Acido paracético, etc.
5. Descartar la membrana con material bioinfeccioso.

Anexo 14: “Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities”

Sterilization Procedure	Sterilization Exposure Time	High-level Disinfection (exposure time 12-30 m at ≥20°C)	Intermediate Disinfection (exposure time ≥1 m)	Low-level Disinfection (exposure time ≥1 m)
Glutaraldehyde-based formulations (>2% glutaraldehyde, caution should be exercised with all glutaraldehyde formulations when further in-use dilution is anticipated); glutaraldehyde (1.12%) and 1.93% phenol/phenate. One glutaraldehyde-based product has a high-level disinfection claim of 5 minutes at 35°C.	10 h at 20–25°C	Hydrogen peroxide (7.35%) and 0.23% peracetic acid; hydrogen peroxide 1% and peracetic acid 0.08% (will corrode metal instruments)	Iodophor germicidal detergent solution (follow product label for use-dilution)	Iodophor germicidal detergent solution (follow product label for use-dilution)
Hydrogen peroxide 7.5% (will corrode copper, zinc, and brass)	6 h	Wet pasteurization at 70°C for 30 minutes with detergent cleaning ⁶	n/a	Quaternary ammonium germicidal detergent solution (follow product label for use-dilution)
Peracetic acid, concentration variable but 0.2% or greater is sporicidal. Peracetic acid immersion system operates at 50-56°C	12 m at 50–56°C	Hypochlorite Hypochlorite, single use chlorine generated on-site by electrolyzing saline containing >650-675 active free chlorine; (will corrode metal instruments)	n/a	n/a
Hydrogen peroxide (7.35%) and 0.23% peracetic acid; hydrogen peroxide 1% and peracetic acid 0.08% (will corrode metal instruments)	3–8 h	n/a	n/a	n/a

Sterilization Procedure	Sterilization Exposure Time	High-level Disinfection (exposure time 12-30 m at $\geq 20^{\circ}\text{C}$)	Intermediate Disinfection (exposure time ≥ 1 m)	Low-level Disinfection (exposure time ≥ 1 m)
Heat sterilization, including steam or hot air (see manufacturer's recommendations, steam sterilization processing time from 3-30 minutes)	Manufacturer's recommendations	Glutaraldehyde-based formulations ($>2\%$ glutaraldehyde, caution should be exercised with all glutaraldehyde formulations when further in-use dilution is anticipated); glutaraldehyde (1.12%) and 1.93% phenol/phenate. One glutaraldehyde-based product has a high-level disinfection claim of 5 minutes at 35°C .	Ethyl or isopropyl alcohol (70-90%)	Ethyl or isopropyl alcohol (70-90%)
Ethylene oxide gas (see manufacturer's recommendations, generally 1-6 hours processing time plus aeration time of 8-12 hours at $50-60^{\circ}\text{C}$)	Manufacturer's recommendations	Ortho-phthalaldehyde (OPA) 0.55%	Sodium hypochlorite (5.25-6.15% household bleach diluted 1:500 provides >100 ppm available chlorine) ⁵	Sodium hypochlorite (5.25-6.15% household bleach diluted 1:500 provides >100 ppm available chlorine)
Hydrogen peroxide gas plasma (see manufacturer's recommendations for internal diameter and length restrictions, processing time between 45-72 minutes).	Manufacturer's recommendations	Hydrogen peroxide 7.5% (will corrode copper, zinc, and brass)	Phenolic germicidal detergent solution (follow product label for use-dilution)	Phenolic germicidal detergent solution (follow product label for use-dilution)

Anexo 15: Carta comité de ética



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
COMITÉ DE ÉTICA DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD

ACTA DE RESOLUCIÓN PROTOCOLO 012-2018

ACTA Nº: 023-2018
ACTA DE EVALUACIÓN
PROTOCOLO DE ESTUDIO EN SALUD Nº 012-2018

En Antiguo Cuscatlán, a los 31 días del mes de agosto del 2018, el Consejo del Comité de Ética de Investigación en Salud de UJMD (CEIS-UJMD), con asistencia de sus miembros permanentes han revisado los documentos presentados por: Br. Ana Lorena Aquino Obando, Br. Salvador Alejandro Caceros Díaz, Br. Carlos Eduardo Escobar Magaña, a saber:

1. Protocolo: "Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina".
2. Consentimiento informado.

En consecuencia, el Comité de Ética de Investigación en Salud de la Universidad Dr. José Matías delgado, resuelve que el protocolo es: **Aprobado**.

Dr. Ricardo José Salinas Olivares
Presidente



Dra. Cecilia Ivonne Rodríguez Bellegarrigue
Secretaria

cc

- Dr. José Nicolás Astacio Soria, Decano FACSALV
- * Br. Carlos Eduardo Escobar Magaña
- Ana Lorena Aparicio, Asistente Administrativo CEIS-UJMD

Anexo 16: Resultado de API 20E

Imagen 19: Resultado de API 20E

API 20 E V4.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

IDENTIFICACION ACEPTABLE	
Galería	API 20 E V4.1
Perfil	0 1 0 4 7 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra					
Serratia fonticola	89.3	0.51	ONPG	99%	CIT	75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Enterobacter aerogenes	2.3	0.2	ONPG	99%	LDC	99%	CIT	82%	VP	85%

BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO	
Galería	API 20 E V4.1
Perfil	2 2 0 6 0 4 7
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Pseudomonas aeruginosa	76.4	0.44	MEL	10%	AMY	1%	ARA	25%		
Pseudomonas fluorescens/putida	23.5	0.35	GLU	25%	MEL	25%	AMY	1%	ARA	20%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Pseudomonas luteola	0.1	0.0	ONPG	86%	GEL	13%	MEL	15%	AMY	1%
			OX	0%						

Pruebas complementarias(s)	42°C	Tween 80	NO3-->N2
Pseudomonas aeruginosa	98%	94%	56%
Pseudomonas fluorescens	2%	+(-)	0%
Pseudomonas putida	4%	-	0%

BAJA DISCRIMINACION	
Galería	API 20 E V4.1
Perfil	0 2 1 0 0 0 4
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Brucella</i> spp

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Myroides</i> spp/ <i>Chryseobacterium indologenes</i>	47.3	0.92	GEL	75%		
<i>Bordetella</i> / <i>Alcaligenes</i> / <i>Moraxella</i> spp	25.6	0.87	URE	14%		
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	21.7	0.86	URE	25%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2.7	0.68	CIT	12%	IND	75% GEL 80%

Pruebas complementarias(s)	AMARILLO	GLUCOSAAs	ESC (HYD.)	Tween 80
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	+	NT	-
<i>Bordetella</i> spp	2%	2%	0%	-
<i>Alcaligenes</i> spp	-	-(+)	-	-
<i>Moraxella</i> spp	2%	2%	0%	v
<i>Brucella</i> spp	-	NT	NT	NT
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	98%	98%	98%	93%
<i>Myroides</i> spp	98%	2%	2%	88%

BAJA DISCRIMINACION	
Galería	API 20 E V4.1
Perfil	0 2 0 1 0 0 0
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> POSIBILIDAD DE <i>Brucella</i> spp

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	88.1	0.92	VP	25%		
<i>Bordetella</i> / <i>Alcaligenes</i> / <i>Moraxella</i> spp	5.9	0.72	VP	25%	OX	95%
Non-fermenter spp	3.0	0.66	VP	15%	OX	93%
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.5	0.66	VP	15%	OX	90%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Pseudomonas luteola</i>	0.1	0.48	ONPG	86%	ADH	75% VP 25% GLU 84%
			ARA	85%		

Pruebas complementarias(s)	OF/O	Tween 80	GLUCOSAAs	42°C
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	47%	-	+	-(+)
<i>Bordetella</i> spp	0%	-	2%	+(-)
<i>Alcaligenes</i> spp	0%	-	-(+)	-(+)
<i>Moraxella</i> spp	0%	v	2%	v
<i>Brucella</i> spp	0%	NT	NT	-
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	98%	2%	98%	2%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	98%	100%	-(+)	+
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	98%	100%	-(+)	-
Non-fermenter spp	48%	+(-)	+(-)	+(-)

Se observan resultados de los biocódigos de las bacterias Gram negativas aisladas por medio de la prueba identificación API 20E. Fuente: Imagen obtenida por equipo investigador utilizando API web.

Anexo 17: Permisos solicitados para realización del estudio



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vásquez
Escuela de Posgrados

Antiguo Cuscatlán, Lunes 16 de Julio 2018

Doctora Claudia María Lara

Coordinadora de Área Clínica de la FACSALV

Presente:

Reciba un cordial saludo, Dra. Lara el motivo de la presente es para notificarle que realizaremos el estudio "Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina." Como tesis para optar al título de Doctor en Medicina. Dicho estudio será realizado por los médicos en año social: Ana Lorena Aquino Obando, Salvador Alejandro Caceros Díaz y Carlos Eduardo Escobar Magaña. Con la asesoría de la Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio Menjívar.

El estudio consistirá en determinar cuáles son las bacterias que se encuentran en las membranas de estetoscopios de los estudiantes de medicina que cursen materias del área clínica, dando prioridad a las involucradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), para luego determinar la eficacia de un dispositivo comercial de venta libre que emite luz ultravioleta-C para eliminar estos microorganismos. La importancia de este tipo de investigación es determinar la capacidad que tiene el personal de salud y sus instrumentos para ser fuente de transmisión de patógenos relacionados en infecciones con un alto costo para el sistema de salud y aportar una opción accesible que demuestre ser eficaz para prevenir esta problemática.

Le solicitamos de la manera más atenta su autorización para que los estudiantes que durante el ciclo 2/2018 cursen las materias de Cirugía 1, Pediatría 1 y Medicina Interna 2 puedan participar en el estudio, proporcionando las membranas de sus estetoscopios, las cuales se utilizarán para realizar cultivos previo y posterior a la aplicación de 10 minutos de luz ultravioleta-C. Para esto se comunicará y se

organizara la recolección de membranas con los coordinadores de materias y los representantes de año de cada curso. Se tiene programada la recolección de estas en las fechas: del 10 al 14 septiembre para Cirugía 1 y del 22 al 27 de octubre para Pediatría 1 y Medicina Interna 2. Estas fechas corresponden a la realización de los primeros y segundos parciales, con la finalidad de no interferir con las actividades prácticas de los estudiantes.

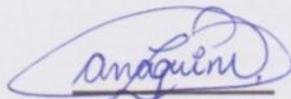
El proceso de recolección incluirá una charla previa a la realización de sus exámenes, en la cual se explicará en que consiste el estudio y en la que se solicite su participación. Posterior a finalizar sus exámenes cada estudiante al que le interese participar será dirigido a un aula cercana en la que se le explicará de forma individual la dinámica del estudio, aclarando cualquier duda y en caso de desear participar se pedirá llenar un consentimiento informado. Las membranas serán introducidas en bolsas plásticas estériles identificadas con un sistema de codificación, este código almacenado en una base de datos y se entregara una copia al estudiante para la devolución en un plazo máximo de 3 días. Las membranas se trasladarán al laboratorio de medicina de la FACSALV en donde se realizarán las pruebas. El equipo investigador se compromete a devolver las membranas en el lapso establecido y reponer éstas en caso de daño o extravío.

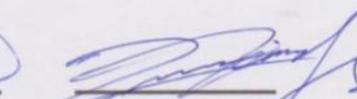
A cada participante se le entregará el resultado del crecimiento bacteriano previo y posterior a la aplicación de luz ultravioleta-C con las recomendaciones según sea el caso.

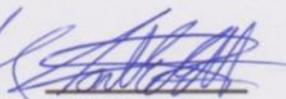
Se anexa una copia del cronograma y del consentimiento informado.

A la espera de una resolución favorable a nuestra petición.

Atentamente.


Br. Ana Aquino


Br. Salvador Caceros


Br. Carlos Escobar

Vobo
Am
17/7/18



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
Facultad de Ciencias de la Salud
Dr. Luis Edmundo Vasquez
Escuela de Posgrados

Antiguo Cuscatlán, Lunes 16 de Julio 2018

Doctora Leonor Isabel Murillo de Linares

Coordinadora del Área de Microbiología de la FACSALV

Presente:

Reciba un cordial saludo, Dra. Murillo de Linares, el motivo de la presente es para notificarle que realizaremos el estudio "Eficacia de la luz ultravioleta-C en la eliminación de bacterias asociadas a infecciones nosocomiales aisladas en estetoscopios de estudiantes de medicina." Como tesis para optar al título de Doctor en Medicina. Dicho estudio será realizado por los médicos en año social: Ana Lorena Aquino Obando, Salvador Alejandro Caceros Díaz y Carlos Eduardo Escobar Magaña. Con la asesoría de la Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio Menjivar.

El estudio consistirá en determinar cuáles son las bacterias que se encuentran en las membranas de estetoscopios de los estudiantes de medicina que cursen materias del área clínica, dando prioridad a las involucradas en las infecciones asociadas a la atención sanitaria (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), para luego determinar la eficacia de un dispositivo comercial de venta libre que emite luz ultravioleta-C para eliminar estos microorganismos. La importancia de este tipo de investigación es determinar la capacidad que tiene el personal de salud y sus instrumentos para ser fuente de transmisión de patógenos relacionados en infecciones con un alto costo para el sistema de salud y aportar una opción accesible que demuestre ser eficaz para prevenir esta problemática.

Le solicitamos de la manera más atenta nos conceda utilizar las instalaciones del laboratorio de medicina para el análisis microbiológico de un aproximado de 88 membranas de estetoscopios de los estudiantes de medicina del área clínica de la FACSALV. Este análisis consistirá en la toma de cultivo previo y posterior a la aplicación de 10 minutos de luz ultravioleta-C a través de un dispositivo comercial,

para luego realizar pruebas de identificación bacteriana. Solicitamos su aprobación para la preparación y almacenamiento de los medios de cultivo: Tripticasa Soya agar, Plate Count agar y Agar cromogénico. Además de la realización de pruebas de identificación bacteriana: Tinción de Gram, Coagulasa, Catalasa y API 20E.

Se pretende la realización de estos procedimientos en las fechas del 10 al 14 septiembre y del 22 al 27 de octubre del presente año, fechas en las que los estudiantes se encontraran realizando sus exámenes parciales. Los horarios de trabajo serán coordinados con la Dra. Tatiana Ascencio para no interferir con las actividades académicas que ahí se realicen. Pretendemos trabajar al mediodía, después de las 3 pm o sábados en la mañana.

Nos responsabilizaremos del cuidado del laboratorio y en dado caso que ocurriera cualquier daño ocasionado al área.

Todo lo utilizado en nuestra investigación será comprado y conseguido por el equipo investigador y cualquier material sobrante será donado al laboratorio.

Anexamos copia del cronograma del estudio.

A la espera de una resolución favorable a nuestra petición,

Atentamente,

Autorizado
[Firma]



[Firma]

Br. Ana Aquino

[Firma]

Br. Salvador Caceros

[Firma]

Br. Carlos Escobar

Referencias Bibliográficas

1. Talbot, Thomas R. “Public Reporting of Health Care–Associated Surveillance Data: Recommendations From the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee.” *Annals of Internal Medicine* 159, no. 9 (November 5, 2013): 631. doi:10.7326/0003-4819-159-9-201311050-00011.
2. Magill, Shelley S., Jonathan R. Edwards, Wendy Bamberg, Zintars G. Beldavs, Ghinwa Dumyati, Marion A. Kainer, Ruth Lynfield, et al. “Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections.” *The New England Journal of Medicine* 370, no. 13 (March 27, 2014): 1198–1208. doi:10.1056/NEJMoa1306801.
3. Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, and et al. “Health Care–associated Infections: A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the Us Health Care System.” *JAMA Internal Medicine* 173, no. 22 (December 9, 2013): 2039–2046. doi:10.1001/jamainternmed.2013.9763.
4. Cardoso, Teresa, Mónica Almeida, N. Deborah Friedman, Irene Aragão, Altamiro Costa-Pereira, António E. Sarmento, and Luís Azevedo. “Classification of Healthcare-associated Infection: a Systematic Review 10 Years After the First Proposal.” *BMC Medicine* 12 (March 6, 2014): 40. doi:10.1186/1741-7015-12-40.
5. Sievert DM, et. al “Antimicrobial-resistant Pathogens Associated with Healthcare-associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010”- PubMed - NCBI.” Accessed February 19, 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221186>.
6. Weiner, Lindsey M., Amy K. Webb, Brandi Limbago, Margaret A. Dudeck, Jean Patel, Alexander J. Kallen, Jonathan R. Edwards, and Dawn M. Sievert. “Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014.” *Infection Control and Hospital Epidemiology* 37, no. 11 (November 2016): 1288–1301. doi:10.1017/ice.2016.174.
7. Reinert, Ralf Rene, Donald E. Low, Flávia Rossi, Xiaojiang Zhang, Chand Wattal, y Michael J. Dowzicky. «Antimicrobial Susceptibility among Organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America Collected as Part of TEST and the in Vitro Activity of Tigecycline». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, n.º 5 (1 de noviembre de 2007): 1018-29. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm310>.
8. Guzmán-Blanco, Manuel, Jaime A. Labarca, Maria Virginia Villegas, and Eduardo Gotuzzo. “Extended Spectrum B-lactamase Producers Among Nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America.” *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 18, no. 4 (July 1, 2014): 421–433. doi:10.1016/j.bjid.2013.10.005.

9. Kramer, Axel, Ingeborg Schwebke, and Günter Kampf. "How Long Do Nosocomial Pathogens Persist on Inanimate Surfaces? A Systematic Review." *BMC Infectious Diseases* 6 (August 16, 2006): 130. doi:10.1186/1471-2334-6-130.
10. Messina, Gabriele, Mattia Fattorini, Nicola Nante, Daniele Rosadini, Andrea Serafini, Marco Tani, and Gabriele Cevenini. "Time Effectiveness of Ultraviolet C Light (UVC) Emitted by Light Emitting Diodes (LEDs) in Reducing Stethoscope Contamination." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, no. 10 (September 23, 2016): 940. doi:10.3390/ijerph13100940.
11. Longtin, Yves, Alexis Schneider, Clément Tschopp, Gesuèle Renzi, Angèle Gayet-Ageron, Jacques Schrenzel, and Didier Pittet. "Contamination of Stethoscopes and Physicians' Hands After a Physical Examination." *Mayo Clinic Proceedings* 89, no. 3 (March 1, 2014): 291–299. doi:10.1016/j.mayocp.2013.11.016.
12. Uneke, Chigozie J., Annayo Ogbonna, Patrick G. Oyibo, and Christian M. Onu. "Bacterial contamination of stethoscopes used by health workers: public health implications." *Journal of Infection in Developing Countries* 4, no. 7 (August 4, 2010): 436–441.
13. Loveday, H. P., J. A. Wilson, R. J. Pratt, M. Golsorkhi, A. Tingle, A. Bak, J. Browne, J. Prieto, and M. Wilcox. "Epic3: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England." *Journal of Hospital Infection* 86, no. Supplement 1. Epic3: National Evidence-Based Guidelines for Preventing Healthcare-Associated Infections in NHS Hospitals in England (January 1, 2014): S1–S70. doi:10.1016/S0195-6701(13)60012-2.
14. William A. Rutala, Ph.D., M.P.H., David J. Weber, M.D., M.P.H. "Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 - 47378 | Guidelines and Recommendations." Accessed December 15, 2017. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/47378>.
15. Yin, Rui, Tianhong Dai, Pinar Avci, Ana Elisa Serafim Jorge, Wanessa CMA de Melo, Daniela Vecchio, Ying-Ying Huang, Asheesh Gupta, and Michael R Hamblin. "Light Based Anti-infectives: Ultraviolet C Irradiation, Photodynamic Therapy, Blue Light, and Beyond." *Current Opinion in Pharmacology* 13, no. 5 (October 2013). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.009>.
16. Aleem, Numra Abdul, Moaz Aslam, Mohammad Faizan Zahid, Arshalooz JamilaRahman, and Fazl Ur Rehman. "Treatment of Burn Wound Infection Using Ultraviolet Light: A Case Report." *The Journal of the American College of Clinical Wound Specialists* 5, no. 1 (July 19, 2014): 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.iccw.2014.07.002>.

17. Dai, Tianhong, Mark S Vrahas, Clinton K Murray, and Michael R Hamblin. "Ultraviolet C Irradiation: An Alternative Antimicrobial Approach to Localized Infections?" *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10, no. 2 (February 2012): 185–95. <https://doi.org/10.1586/eri.11.166>.
18. Dai, Tianhong, Barbara Garcia, Clinton K. Murray, Mark S. Vrahas, and Michael R. Hamblin. "UVC Light Prophylaxis for Cutaneous Wound Infections in Mice." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, no. 7 (July 1, 2012): 3841–48. <https://doi.org/10.1128/AAC.00161-12>.
19. Gupta, Asheesh, Pinar Avci, Tianhong Dai, Ying-Ying Huang, and Michael R. Hamblin. "Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation." *Advances in Wound Care* 2, no. 8 (October 2013): 422–37. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0366>.
20. Stone, Patricia W. "Economic Burden of Healthcare-Associated Infections: An American Perspective." *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 9, no. 5 (October 2009): 417–22. <https://doi.org/10.1586/erp.09.53>.
21. Marcel, J. -P., M Alfa, F Baquero, J Etienne, H Goossens, S Harbarth, W Hryniewicz, et al. "Healthcare-associated Infections: Think Globally, Act Locally." *Clinical Microbiology and Infection* 14, no. 10 (October 1, 2008): 895–907. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02074.x.
22. Rosenthal, Victor D., Dennis G. Maki, Silom Jamulitrat, Eduardo A. Medeiros, Subhash Kumar Todi, David Yepes Gomez, Hakan Leblebicioglu, et al. "International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009." *American Journal of Infection Control* 38, no. 2 (March 2010): 95–104.e2. doi:10.1016/j.ajic.2009.12.004.
23. Licor, Pacheco, Vicente Mario, Gutiérrez Castañeda, Dianelys de la Caridad, and Marly Serradet Gómez. "Vigilancia Epidemiológica De Infecciones Asociadas a La Asistencia Sanitaria." *Revista De Ciencias Médicas De Pinar Del Río* 18, no. 3 (June 2014): 430–440.
24. Nogueira Junior Cassimiro, Mello Débora Silva de, Padoveze Maria Clara, Boszczowski Icaro, Levin Anna Sara, Lacerda Rubia Aparecida. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Dec 15]; 30(1): 11-20. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2014000100011&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00044113>
25. Durlach, R., G. McIlvenny, R. G. Newcombe, G. Reid, L. Doherty, C. Freuler, V. Rodríguez, A. G. Duse, and E. T. M. Smyth. "Prevalence survey of healthcare-associated infections in Argentina; comparison with England, Wales, Northern Ireland

and South Africa.” *The Journal of Hospital Infection* 80, no. 3 (March 2012): 217–223. doi:10.1016/j.jhin.2011.12.001.

26. National Nosocomial Infections Surveillance System. “National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.” *American Journal of Infection Control* 32, no. 8 (December 2004): 470–485. doi:10.1016/S0196655304005425.

27. Marschall, Jonas, Denis Agniel, Victoria J. Fraser, Joshua Doherty, and David K. Warren. “Gram-negative Bacteraemia in non-ICU Patients: Factors Associated with Inadequate Antibiotic Therapy and Impact on Outcomes.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, no. 6 (June 2008): 1376–1383. doi:10.1093/jac/dkn104.

28. Yang, Jui-Hsuan, Un-In Wu, Huei-Min Tai, y Wang-Huei Sheng. «Effectiveness of an Ultraviolet-C Disinfection System for Reduction of Healthcare-Associated Pathogens». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 0, n.º 0 (23 de septiembre de 2017). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.017>.

29. Nerandzic, Michelle M., Priyaleela Thota, Thriveen Sankar C, Annette Jencson, Jennifer L. Cadnum, Amy J. Ray, Robert A. Salata, Richard R. Watkins, y Curtis J. Donskey. «Evaluation of a Pulsed Xenon Ultraviolet Disinfection System for Reduction of Healthcare-Associated Pathogens in Hospital Rooms». *Infection Control & Hospital Epidemiology* 36, n.º 2 (febrero de 2015): 192-97. <https://doi.org/10.1017/ice.2014.36>.

30. Napolitano, Nathanael A., Tanmay Mahapatra, y Weiming Tang. «The Effectiveness of UV-C Radiation for Facility-Wide Environmental Disinfection to Reduce Health Care–acquired Infections». *American Journal of Infection Control* 43, n.º 12 (1 de diciembre de 2015): 1342-46. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.006>.

31. Gostine, Andrew, David Gostine, Cristina Donohue, y Luke Carlstrom. «Evaluating the Effectiveness of Ultraviolet-C Lamps for Reducing Keyboard Contamination in the Intensive Care Unit: A Longitudinal Analysis». *American Journal of Infection Control* 44, n.º 10 (1 de octubre de 2016): 1089-94. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.012>.

32. Nerandzic, Michelle M, Jennifer L Cadnum, Kevin E Eckart, y Curtis J Donskey. «Evaluation of a hand-held far-ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens». *BMC Infectious Diseases* 12 (16 de mayo de 2012): 120. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-120>.

33. Moore, Ginny, Shanom Ali, Elaine A Cloutman-Green, Christina R Bradley, Martyn AC Wilkinson, John C Hartley, Adam P Fraise, y A Peter R Wilson. «Use of UV-C radiation to disinfect non-critical patient care items: a laboratory assessment of the Nanoclave Cabinet». *BMC Infectious Diseases* 12 (3 de agosto de 2012): 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-174>.

34. Timmermann, Lisa F., Klaus Ritter, David Hillebrandt, y Thomas Küpper. «Drinking Water Treatment with Ultraviolet Light for Travelers – Evaluation of a Mobile Lightweight System». *Travel Medicine and Infectious Disease* 13, n.º 6 (1 de noviembre de 2015): 466-74. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2015.10.005>.
35. Li, Lisa M., Titus Wong, Emily Rose, Graham Wickham, y Elizabeth Bryce. «Evaluation of an Ultraviolet C Light-emitting Device for Disinfection of Electronic Devices». *American Journal of Infection Control* 44, n.º 12 (1 de diciembre de 2016): 1554-57. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.028>.
36. Mathew, J. Itty, Jennifer L. Cadnum, Thriveen Sankar, Annette L. Jencson, Sirisha Kundrapu, y Curtis J. Donskey. «Evaluation of an Enclosed Ultraviolet-C Radiation Device for Decontamination of Mobile Handheld Devices». *American Journal of Infection Control* 44, n.º 6 (1 de junio de 2016): 724-26. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.12.043>.
37. Al-Tawfiq, Jaffar A., y Paul A. Tambyah. «Healthcare Associated Infections (HAI) Perspectives». *Journal of Infection and Public Health* 7, n.º 4 (1 de julio de 2014): 339-44. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.04.003>.
38. Pearson, A. «Historical and Changing Epidemiology of Healthcare-Associated Infections». *Journal of Hospital Infection* 73, n.º 4 (1 de diciembre de 2009): 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.08.016>.
39. Khan, Hassan Ahmed, Fatima Kanwal Baig, y Riffat Mehboob. «Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance». *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7, n.º 5 (1 de mayo de 2017): 478-82. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>.
40. «Healthcare-Associated Infections Acquired in Intensive Care Units - Annual Epidemiological Report 2016 [2014 Data]». European Centre for Disease Prevention and Control, 7 de junio de 2017. <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/infections-acquired-intensive-care-units-annual-report-2016>.
41. Bonnal, C., G. Birgand, I. Lolom, S. Diamantis, C. Dumortier, F. L'Heriteau, L. Armand-Lefevre, y J. C. Lucet. «Staphylococcus aureus healthcare associated bacteraemia: An indicator of catheter related infections». *Médecine et Maladies Infectieuses* 45, n.º 3 (1 de marzo de 2015): 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.01.002>.
42. David, Michael Z., Susan Boyle-Vavra, Diana L. Zychowski, y Robert S. Daum. «Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus as a Predominantly Healthcare-Associated Pathogen: A Possible Reversal of Roles?» *PLoS ONE* 6, n.º 4 (13 de abril de 2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018217>.

43. Cassat, James E., Chia Y. Lee, y Mark S. Smeltzer. «Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 391 (2007): 127-44. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-468-1_10.
44. Pandey, Anita, Ashish K. Asthana, Rupesh Tiwari, Lalit Kumar, Anupam Das, y Molly Madan. «Physician Accessories: Doctor, What You Carry Is Every Patient's Worry?» *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 53, n.º 4 (10 de enero de 2010): 711. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.72047>.
45. Matsuo, M., S. Oie, y H. Furukawa. «Contamination of blood pressure cuffs by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and preventive measures». *Irish Journal of Medical Science* 182, n.º 4 (2013): 707-9. <https://doi.org/10.1007/s11845-013-0961-7>.
46. Bishara, Jihad, Elad Goldberg, Leonard Leibovici, Zmira Samra, Hila Shaked, Nariman Mansur, y Mical Paul. «Healthcare-Associated vs. Hospital-Acquired *Staphylococcus Aureus* Bacteremia». *International Journal of Infectious Diseases* 16, n.º 6 (1 de junio de 2012): e457-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.02.009>.
47. Point Prevalence of Healthcare-Associated Infections and Antibiotic Use in Three Large Swiss Acute-Care Hospitals». Accedido 22 de mayo de 2018. <https://doi.org/10.4414/smw.2018.14617>.
48. Kolpa, Małgorzata, Marta Wałaszek, Agnieszka Gniadek, Zdzisław Wolak, y Wiesław Dobroś. «Incidence, Microbiological Profile and Risk Factors of Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units: A 10 Year Observation in a Provincial Hospital in Southern Poland». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, n.º 1 (enero de 2018). <https://doi.org/10.3390/ijerph15010112>.
49. Apisarnthanarak, Anucha, Pattarachai Kiratisin, y Linda M. Mundy. «Clinical and Molecular Epidemiology of Healthcare-Associated Infections Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing Strains of *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* That Harbor Multiple ESBL Genes». *Infection Control and Hospital Epidemiology* 29, n.º 11 (noviembre de 2008): 1026-34. <https://doi.org/10.1086/591864>.
50. Cheong, Hae Suk, Cheol-In Kang, Ki Tae Kwon, Sang Tack Heo, Yu Mi Wi, Eun Seok Kim, Jin Seo Lee, et al. «Clinical Significance of Healthcare-Associated Infections in Community-Onset *Escherichia Coli* Bacteraemia». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, n.º 6 (1 de diciembre de 2007): 1355-60. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm378>.
51. Franz, Eelco, Christiaan Veenman, Angela H. A. M. van Hoek, Ana de Roda Husman, y Hetty Blaak. «Pathogenic *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater». *Scientific Reports* 5 (24 de septiembre de 2015). <https://doi.org/10.1038/srep14372>.
52. Adamus-Białek, Wioletta, Anna Kubiak, y Grzegorz Czerwonka. «Analysis of Uropathogenic *Escherichia Coli* Biofilm Formation under Different Growth Conditions».

Acta Biochimica Polonica 62, n.º 4 (2015): 765-71.
https://doi.org/10.18388/abp.2015_1127.

53. Saltoglu, N., R. Karali, M. Yemisen, R. Ozaras, I. I. Balkan, B. Mete, F. Tabak, A. Mert, N. Hondur, y R. Ozturk. «Comparison of Community-Onset Healthcare-Associated and Hospital-Acquired Urinary Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia Coli* and Antimicrobial Activities». *International Journal of Clinical Practice* 69, n.º 7 (1 de julio de 2015): 766-70.
<https://doi.org/10.1111/ijcp.12608>.

54. Hoang, S., A. Georget, J. Asselineau, A-G. Venier, C. Leroyer, A. M. Rogues, y R. Thiébaud. «Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France». *PLoS ONE* 13, n.º 3 (9 de marzo de 2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193300>.

55. Parcell, B.J., K. Oravcova, M. Pinheiro, M.T.G. Holden, G. Phillips, J.F. Turton, y S.H. Gillespie. «*Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing». *The Journal of Hospital Infection* 98, n.º 3 (marzo de 2018): 282-88. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.005>.

56. Solomon, Fithamlak Bisetegen, Fiseha Wadilo, Efrata Girma Tufa, y Meseret Mitiku. «Extended spectrum and metallo beta-lactamase producing airborne *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in restricted settings of a referral hospital: a neglected condition». *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 6 (23 de octubre de 2017). <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0266-0>.

57. Miyoshi-Akiyama, Tohru, Tatsuya Tada, Norio Ohmagari, Nguyen Viet Hung, Prasit Tharavichitkul, Bharat Mani Pokhrel, Marek Gniadkowski, Masahiro Shimojima, y Teruo Kirikae. «Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*». *Genome Biology and Evolution* 9, n.º 12 (29 de noviembre de 2017): 3238-45. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx243>.

58. Tsao, Li-Hsin, Chih-Yi Hsin, Hsin-Yi Liu, Han-Chuan Chuang, Li-Yuan Chen, y Yuarn-Jang Lee. «Risk Factors for Healthcare-Associated Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 0, n.º 0 (5 de octubre de 2017). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.015>.

59. Djordjevic, Zorana M., Marko M. Folic, y Slobodan M. Jankovic. «Previous Antibiotic Exposure and Antimicrobial Resistance Patterns of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Nosocomial Infections». *Balkan Medical Journal* 34, n.º 6 (diciembre de 2017): 527-33.
<https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2016.1844>.

60. Hong, Sung Kuk, Seung Jun Choi, Saeam Shin, Wonmok Lee, Naina Pinto, Nari Shin, Kwangjun Lee, et al. «Establishing Quality Control Ranges for Antimicrobial

Susceptibility Testing of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*: A Cornerstone to Develop Reference Strains for Korean Clinical Microbiology Laboratories». *Annals of Laboratory Medicine* 35, n.º 6 (noviembre de 2015): 635-38. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.635>.

61. York, Mary K., Ellen Jo Baron, Jill E. Clarridge, Richard B. Thomson, y Melvin P. Weinstein. «Multilaboratory Validation of Rapid Spot Tests for Identification of *Escherichia coli*». *Journal of Clinical Microbiology* 38, n.º 9 (septiembre de 2000): 3394-98.

62. Heraud, Sandrine, Anne-Marie Freydiere, Anne Doleans-Jordheim, Michèle Bes, Anne Tristan, François Vandenesch, Frederic Laurent, y Olivier Dauwalder. «Direct Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Susceptibility From Positive Blood-Culture Bottles in a Bact/ALERT System Using Binax Now *S. aureus* and PBP2a Tests». *Annals of Laboratory Medicine* 35, n.º 4 (julio de 2015): 454-57. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.4.454>.

63. Reasoner, Donald J. «Heterotrophic plate count methodology in the United States». *International Journal of Food Microbiology*, HPC Bacteria in Drinking Water: Public Health Implications, 92, n.º 3 (1 de mayo de 2004): 307-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.008>

64. Reasoner, D J, y E E Geldreich. «A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water.» *Applied and Environmental Microbiology* 49, n.º 1 (enero de 1985): 1-7.

65. Bugno, Adriana, Adriana Aparecida Buzzo Almodóvar, y Tatiana Caldas Pereira. «Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: Comparison of the efficiency of reasoner'2 agar and plate count agar». *Brazilian Journal of Microbiology* 41, n.º 1 (2010): 15-18. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100003>.

66. Brugger, Silvio D., Christian Baumberger, Marcel Jost, Werner Jenni, Urs Brugger, y Kathrin Mühlemann. «Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates». *PLoS ONE* 7, n.º 3 (20 de marzo de 2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033695>.

67. Moss, C. Wayne, y M. L. Speck. «Identification of Nutritional Components in Trypticase Responsible for Recovery of *Escherichia coli* Injured by Freezing1». *Journal of Bacteriology* 91, n.º 3 (marzo de 1966): 1098-1104.

68. Weinstein, M P, L B Reller, S Mirrett, W L Wang, y D V Alcid. «Controlled evaluation of Trypticase soy broth in agar slide and conventional blood culture systems.» *Journal of Clinical Microbiology* 21, n.º 4 (abril de 1985): 626-29.

69. Alturkistani, Hani A, Faris M Tashkandi, y Zuhair M Mohammedsaleh. «Histological Stains: A Literature Review and Case Study». *Global Journal of Health Science* 8, n.º 3 (marzo de 2016): 72-79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>.

70. Brown, R. C., y H. C. Hopps. «Staining of Bacteria in Tissue Sections: A Reliable Gram Stain Method». *American Journal of Clinical Pathology* 60, n.º 2 (agosto de 1973): 234-40.
71. López-Jácome, Luis Esaú, Melissa Hernández-Durán, Claudia Adriana Colín-Castro, Silvestre Ortega-Peña, Guillermo Cerón-González, y Rafael Franco-Cendejas. «Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología». *Investigación en Discapacidad* 3, n.º 1 (2014): 10-18.
72. Vázquez, Covadonga, Ana Martín, M^a Isabel de Silóniz, y Susana Serrano. «Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias.» *REDUCA (Biología)* 3, n.º 5 (6 de octubre de 2011). <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819>.
73. Koneman, Elmer W., y Stephen Allen. *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2008.
74. Seija V. Cocos Gram Positivos: Aspectos Prácticos. Instituto de Higiene. Facultad de Medicina Universidad de la República. Uruguay. 2002; 19: 1-5. URL disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf> Accedido en Fecha 24 de Mayo de 2018.
75. Reiner, Karen. «Catalase Test Protocol». Text, 11 de noviembre de 2010. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3226>.
76. Katz, D. Sue. «Coagulase Test Protocol». Text, 11 de noviembre de 2010. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3220>.
77. Veenemans, J., C. Verhulst, R. Punselie, P. H. J. van Keulen, y J. A. J. W. Kluytmans. «Evaluation of Brilliance MRSA 2 Agar for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Clinical Samples». *Journal of Clinical Microbiology* 51, n.º 3 (marzo de 2013): 1026-27. <https://doi.org/10.1128/JCM.02995-12>.
78. Dodémont, Magali, Carlo Verhulst, Claire Nonhoff, Carole Nagant, Olivier Denis, y Jan Kluytmans. «Prospective Two-Center Comparison of Three Chromogenic Agars for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Screening in Hospitalized Patients». *Journal of Clinical Microbiology* 53, n.º 9 (septiembre de 2015): 3014-16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01006-15>.
79. Holmes, B, W R Willcox, y S P Lapage. «Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system.» *Journal of Clinical Pathology* 31, n.º 1 (enero de 1978): 22-30.
80. O'Hara, C. M., D. L. Rhoden, y J. M. Miller. «Reevaluation of the API 20E Identification System versus Conventional Biochemicals for Identification of Members of the Family Enterobacteriaceae: A New Look at an Old Product.» *Journal of Clinical Microbiology* 30, n.º 1 (1 de enero de 1992): 123-25.

81. Shayegani, M., P. S. Maupin, y D. M. McGlynn. «Evaluation of the API 20E System for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Bacteria.» *Journal of Clinical Microbiology* 7, n.º 6 (6 de enero de 1978): 539-45.
82. Murray, P. R. «Standardization of the Analytab Enteric (API 20E) System to Increase Accuracy and Reproducibility of the Test for Biotype Characterization of Bacteria.» *Journal of Clinical Microbiology* 8, n.º 1 (7 de enero de 1978): 46-49.
83. OSANTE, NEREA PORRES, y ELENA RUIZ RUIZ. *Microbiología clínica*. Ediciones Paraninfo, S.A., s. f.
84. Csuros, Maria. *Microbiological Examination of Water and Wastewater*. CRC Press, 1999.
85. Dancer, Stephanie J. «Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination». *Clinical Microbiology Reviews* 27, n.º 4 (10 de enero de 2014): 665-90. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14>.
86. Quinn, Margaret M., Paul K. Henneberger, Barbara Braun, George L. Delclos, Kathleen Fagan, Vanthida Huang, Jennifer L. S. Knaack, et al. «Cleaning and Disinfecting Environmental Surfaces in Health Care: Toward an Integrated Framework for Infection and Occupational Illness Prevention». *American Journal of Infection Control* 43, n.º 5 (1 de mayo de 2015): 424-34. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.01.029>.
87. «Healthcare Equipment | Disinfection & Sterilization Guidelines | Guidelines Library | Infection Control | CDC». Accedido 26 de mayo de 2018. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/healthcare-equipment.html>.
88. Boyce, John M. «Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals». *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 5 (11 de abril de 2016): 10. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0111-x>.
89. Ophthalmology (AAO), American Academy of. *Óptica Clínica. 2011-2012: Sección 3*. Elsevier España, 2012.
90. Malacara, Daniel. *Óptica básica*. Fondo de Cultura Económica, 2015.
91. Tipler, Paul Allen, y Gene Mosca. *Física para la ciencia y la tecnología: Electricidad y magnetismo, luz, física moderna*. Reverte, 2005.
92. Kowalski, Wladyslaw. *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection*. Springer Science & Business Media, 2010.
93. Pereira, R. V., M. L. Bicalho, V. S. Machado, S. Lima, A. G. Teixeira, L. D. Warnick, and R. C. Bicalho. «Evaluation of the Effects of Ultraviolet Light on Bacterial Contaminants Inoculated into Whole Milk and Colostrum, and on Colostrum

Immunoglobulin G.” *Journal of Dairy Science* 97, no. 5 (May 2014): 2866–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7601>.

94. Rose, L. J., and E. W. Rice. “Inactivation of Bacterial Biothreat Agents in Water, a Review.” *Journal of Water and Health* 12, no. 4 (December 2014): 618–33. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.038>.

95. Miller, Shelly L., Jacqueline Linnes, and Julia Luongo. “Ultraviolet Germicidal Irradiation: Future Directions for Air Disinfection and Building Applications.” *Photochemistry and Photobiology* 89, no. 4 (August 2013): 777–81. <https://doi.org/10.1111/php.12080>.

96. McDevitt, James J., Stephen N. Rudnick, and Lewis J. Radonovich. “Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light.” *Applied and Environmental Microbiology* 78, no. 6 (March 2012): 1666–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.06960-11>.

97. Steinmann, Eike, Ute Gravemann, Martina Friesland, Juliane Doerrbecker, Thomas H. Müller, Thomas Pietschmann, and Axel Seltsam. “Two Pathogen Reduction Technologies--Methylene Blue plus Light and Shortwave Ultraviolet Light--Effectively Inactivate Hepatitis C Virus in Blood Products.” *Transfusion* 53, no. 5 (May 2013): 1010–18. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03858.x>.

98. Jinadatha, Chetan, Frank C. Villamaria, Marcos I. Restrepo, Nagaraja Ganachari-Mallappa, I.-Chia Liao, Eileen M. Stock, Laurel A. Copeland, and John E. Zeber. “Is the Pulsed Xenon Ultraviolet Light No-Touch Disinfection System Effective on Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Absence of Manual Cleaning?” *American Journal of Infection Control* 43, no. 8 (August 2015): 878–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.04.005>.

99. Vermeulen, Natasha, Werden J. Keeler, Kanavillil Nandakumar, and Kam Tin Leung. “The Bactericidal Effect of Ultraviolet and Visible Light on Escherichia Coli.” *Biotechnology and Bioengineering* 99, no. 3 (February 15, 2008): 550–56. <https://doi.org/10.1002/bit.21611>.

100. Montgomery, Nedra L., and Pratik Banerjee. “Inactivation of Escherichia Coli O157:H7 and Listeria Monocytogenes in Biofilms by Pulsed Ultraviolet Light.” *BMC Research Notes* 8 (June 10, 2015): 235. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1206-9>.

101. Escombe, A. Roderick, David A. J. Moore, Robert H. Gilman, Marcos Navincopa, Eduardo Ticona, Bailey Mitchell, Catherine Noakes, et al. “Upper-Room Ultraviolet Light and Negative Air Ionization to Prevent Tuberculosis Transmission.” *PLoS Medicine* 6, no. 3 (March 17, 2009): e43. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000043>.

102. Risović, Dubravko, Mirela Maver-Bišćanin, Marinka Mravak-Stipetić, Suzana Bukovski, and Alen Bišćanin. “Quantitative Investigation of Efficiency of Ultraviolet and Visible Light in Eradication of Candida Albicans in Vitro.” *Photomedicine and Laser Surgery* 32, no. 4 (April 2014): 232–39. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3691>.

103. Garvey, Mary, Joao Paulo Andrade Fernandes, and Neil Rowan. "Pulsed Light for the Inactivation of Fungal Biofilms of Clinically Important Pathogenic Candida Species." *Yeast (Chichester, England)* 32, no. 7 (July 2015): 533–40. <https://doi.org/10.1002/yea.3077>.
104. Gruendemann, Barbara J. *Prevención de la infección en áreas quirúrgicas*. Elsevier España, 2002.
105. Dai, Tianhong, George P. Tegos, Tyler G. St Denis, Don Anderson, Ed Sinofsky, and Michael R. Hamblin. "Ultraviolet-C Irradiation for Prevention of Central Venous Catheter-Related Infections: An in Vitro Study." *Photochemistry and Photobiology* 87, no. 1 (February 2011): 250–55. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00819.x>.
106. Lindsley, William G., Stephen B. Martin, Robert E. Thewlis, Khachatur Sarkisian, Julian O. Nwoko, Kenneth R. Mead, and John D. Noti. "Effects of Ultraviolet Germicidal Irradiation (UVGI) on N95 Respirator Filtration Performance and Structural Integrity." *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* 12, no. 8 (2015): 509–17. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1018518>.
107. Cooper, Jesse, Elizabeth Bryce, George Astrakianakis, Aleksandra Stefanovic, and Karen Bartlett. "Efficacy of an Automated Ultraviolet C Device in a Shared Hospital Bathroom." *American Journal of Infection Control* 44, no. 12 (December 1, 2016): 1692–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.004>.
108. Vianna, Pedro G., Charles R. Dale, Sarah Simmons, Mark Stibich, and Carmelo M. Licitra. "Impact of Pulsed Xenon Ultraviolet Light on Hospital-Acquired Infection Rates in a Community Hospital." *American Journal of Infection Control* 44, no. 3 (March 1, 2016): 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.10.009>.
109. Hosein, Ian, Rosie Madeloso, Wijayaratnam Nagaratnam, Frank Villamaria, Eileen Stock, and Chetan Jinadatha. "Evaluation of a Pulsed Xenon Ultraviolet Light Device for Isolation Room Disinfection in a United Kingdom Hospital." *American Journal of Infection Control* 44, no. 9 (September 1, 2016): e157-161. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.044>.
110. Jinadatha, Chetan, Ricardo Quezada, Thomas W. Huber, Jason B. Williams, John E. Zeber, and Laurel A. Copeland. "Evaluation of a Pulsed-Xenon Ultraviolet Room Disinfection Device for Impact on Contamination Levels of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus." *BMC Infectious Diseases* 14 (April 7, 2014): 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-187>.
111. LaPorte, Wesley David, Daniel Harrison Barnes, and Brennan Crellin. Portable electronic device sanitizer. United States US9339576B2, filed March 17, 2014, and issued May 17, 2016. <https://patents.google.com/patent/US9339576B2/en>.

112. Porte, Wesley David La, and Daniel Harrison Barnes. Portable Electronic Device Sanitizer. United States US20130063922A1, filed September 13, 2012, and issued March 14, 2013. <https://patents.google.com/patent/US20130063922A1/en>.
113. Villa, J. J., and J. M. A. Pallás. "Métodos de investigación clínica y epidemiológica." (2013).
114. Jinadatha, Chetan et al. Can pulsed xenon ultraviolet light systems disinfect aerobic bacteria in the absence of manual disinfection? *American Journal of Infection Control* , Volume 43 , Issue 4 , 415 – 417
115. Koscova J, Hurnikova Z, Pistl J. Degree of Bacterial Contamination of Mobile Phone and Computer Keyboard Surfaces and Efficacy of Disinfection with Chlorhexidine Digluconate and Triclosan to Its Reduction. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10):2238. Published 2018 Oct 12. doi:10.3390/ijerph15102238.
116. Setlow B., Parish S., Zhang P., et al. Mechanism of killing of spores of *Bacillus anthracis* in a high-temperature gas environment, and analysis of DNA damage generated by various decontamination treatments of spores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*. 2014 Apr; 116(4): 805–814. Published online 2014 Jan 6. doi: 10.1111/jam.12421
117. Messina G, Burgassi S, Messina D, et al. A new UV-LED device for automatic disinfection of stethoscope membranes. *Am J Infect Control*. 2015 Oct 1; 43(10): e61–e66. Published online 2015 Aug 5. doi: 10.1016/j.ajic.2015.06.019
118. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926.
119. Otto M. "Staphylococcus epidermidis - the "accidental" pathogen". *Nature Reviews Microbiology*. 7 (8): 555–567. Published online 2010 August. doi:10.1038/nrmicro2182