

## UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

### RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

### DERECHOS DE PUBLICACIÓN

Basados en

El 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 Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual de Creative Commons  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



*Se permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra siempre que se especifique el autor y el nombre de la publicación y sin objetivos comerciales, y también se permite crear obras derivadas, siempre que sean distribuidas bajo esta misma licencia*

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

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

U.J.M.D.



TRABAJO DE INVESTIGACION.

*“Bacterias aeróbicas nosocomiales multiresistentes en muestras ambientales:  
susceptibilidad a los antisépticos y desinfectantes utilizados en salas de operaciones  
hospitalarias”.*

**AUTORES**

ENRIQUE JAVIER LOZANO  
SERGIO JAVIER SANDOVAL

**ASESOR**

DRA. ANA TERESA MENJIVAR

SAN SALVADOR 29 ENERO 2009

## Índice

1) Planteamiento del problema.....	3
2) Delimitación del tema.....	5
3) Antecedentes.....	7
4) Justificación.....	9
5) Marco Teórico.....	11
5.1) Introducción.....	11
5.2) Antisépticos y desinfectantes. ....	12
5.2.1) Alcohol 70%. ....	12
5.2.3) Yodo 10% ....	13
5.2.4) Fenoles. ....	14
5.2.5) Derivados del amonio cuaternario.....	14
5.3) Resistencia a antisépticos y/o desinfectantes. ....	15
5.4) Resistencia bacteriana antibióticos.....	16
6) Variables.....	19
7) Objetivos.....	21
7.1) Objetivo General:.....	21
7.2) Objetivos Específicos: ....	21
8) Metodología.....	22
8.1) Periodo de Estudio. ....	22
8.2) Tipo de estudio:.....	22
8.3) Población y muestra.....	22
8.4) Criterios de inclusión y exclusión. ....	22
8.5) Procedimientos para recolección y análisis de los datos.....	22
8.5.1) Muestreo.....	22
8.5.3) Técnicas de recolección de la muestra:.....	24
8.5.4) Procesamiento de muestras.....	24
8.6) Descripción de Técnicas a utilizar. ....	26
8.6.1) Prueba de susceptibilidad (antibiograma según técnica Kirby Bauer) <sup>1</sup>	26
8.6.2) Prueba de sensibilidad a Antisépticos y desinfectantes (Coeficiente de fenol). ....	27
8.7) Procedimiento de análisis de datos. ....	28
9) Resultados.....	29
10) Discusión.....	39
11) Conclusiones.....	43
12) Recomendaciones.....	42
13) Técnicas.....	46
14) Glosario.....	60
15) Bibliografía.....	64

## 1) Planteamiento del problema.

La infección nosocomial se puede definir como una infección localizada o sistémica, que por lo general se manifiesta a las 48 horas después del ingreso del paciente y no estaba en proceso de incubación <sup>(3)</sup>. La incidencia de infección nosocomial es elevada, oscilando entre un 5-30% de los pacientes ingresados, siendo más frecuente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos <sup>(18)</sup>. Las infecciones nosocomiales aumentan de forma significativa la morbilidad y la mortalidad, en los últimos años ha aumentado la incidencia por la presencia de microorganismos multiresistentes e infecciones polimicrobianas. Las infecciones nosocomiales más frecuentes son la sepsis, infección respiratoria, infección urinaria e infección de el sitio operatorio <sup>(18)</sup>.

Existen diversos protocolos y estrategias que se utilizan para disminuir la adquisición y diseminación de las infecciones nosocomiales especialmente utilizados previo a un procedimiento quirúrgico, comenzando desde las medidas de asepsia y antisepsia por el cirujano tratante, hasta el empleo de antibióticos profilácticos y el uso de sustancias desinfectantes en sala de operaciones. Se ha documentado la eficacia de las sustancias desinfectantes en los procesos de desinfección. Los mecanismos de acción de los antibióticos son bien conocidos, mientras los de los antisépticos y desinfectantes no están muy claros. Muchos de estos desinfectantes y antisépticos de distintas preparación y concentración han sido utilizados en superficies tanto animadas como inanimadas. El mecanismo de resistencia intrínseca que estas bacterias poseen esta bien documentado y es muy variado; por ejemplo, algunas esporas poseen una corteza bacteriana que actúa como barrera a dicha sustancias, algunas *Mycobacterias* poseen una pared celular serosa que previene que el desinfectante penetre dentro de ellas, y algunas bacterias Gram negativas poseen una pared celular externa que previene que algunas sustancias antisépticas y/o desinfectantes sean absorbidas <sup>(5)</sup>.

El uso indiscriminado de antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos que los capacita para evadir con eficiencia la acción de estos agentes particularmente en el medio hospitalario.

En un estudio realizado en el Hospital Nacional San Rafael (HNSR) durante 6 meses se encontró que 38 pacientes, de un total de casos de 796 (4.77%) intervenidos

quirúrgicamente, desarrollaron Infección del Sitio Operatorio (ISO). De especial importancia fue la observación de alta prevalencia de cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas, con múltiple resistencia a antibióticos, lo cual por razones lógicas, hace más difícil el manejo médico de estos pacientes, incrementando el costo al presupuesto de hospitales nacionales <sup>(4)</sup>. En el HNSR, es necesario la improvisación en ciertas ocasiones sobre las medidas de limpieza y desinfección en salas de operaciones, esto por falta de recursos, así como ocurre en cualquier hospital público del país (ver anexo 2).

Tomando en cuenta lo antes mencionado y el estudio previo, donde se comprueba la existencia de este tipo de bacterias en ISO:

¿Son las bacterias encontradas en el ambiente de las salas de operaciones similares en cuanto a patrones de resistencia a las ya reportadas en ISO?

¿Cuál es la susceptibilidad de las bacterias multiresistentes a las sustancias utilizadas como antisépticos y desinfectantes en el Hospital Nacional San Rafael?

## 2) Delimitación del tema

Este es un trabajo de investigación básica, de tipo descriptivo prospectivo, entre los meses de Septiembre a Diciembre del año 2008 en el país de El Salvador, Santa Tecla Departamento de La Libertad. Se recolectaron muestras del aire y de objetos inanimados (lámpara quirúrgica, cauterio, mesa de operar y anestesia) que aunque estas superficies no entran en contacto directo con el paciente, son un potencial riesgo para las infecciones nosocomiales al entrar en contacto con objetos o personal que si lo hace. No se tomo en cuenta el suelo, porque difícilmente puede tener influencia con las infecciones nosocomiales, debido a que después de su limpieza y desinfección rápidamente se contaminan de nuevo <sup>(14)</sup>. Las muestras provinieron del servicio de sala de operaciones del Hospital Nacional San Rafael. Se obtuvieron exclusivamente de los 5 quirófanos disponibles, 3 de planta y 2 de turno. El total de número de muestras de aire dependió del tamaño de las salas de acuerdo a fórmulas establecidas <sup>(13)</sup>, se obtuvo una muestra a partir de cada objeto inanimado de cada sala de operaciones.

Teniendo en cuenta los estudios previos realizados en el Hospital Nacional San Rafael, se seleccionaron únicamente las bacterias ambientales aeróbicas de relevancia clínica conocida, por su patogenicidad <sup>(4)</sup>. La técnica de prueba de susceptibilidad que se utilizó fue la de Kirby-Bauer, modificada con el comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos de Estados Unidos (NCCLS) <sup>(11)</sup>. Los antibióticos que se emplearon en el estudio de susceptibilidad de las bacterias aisladas pertenecen a las siguientes 5 clases de antibióticos: cefalosporina antipseudomonas (Ceftazidima), carbapenem antipseudomonas (Imipenem), Ampicilina/Sulbactam, fluroquinolona (Ciprofloxacina) y un aminoglucosido (Amikacina) que se reportaron siempre en pruebas de susceptibilidad bacteriana <sup>(30)</sup>.

Para la prueba de susceptibilidad a los desinfectantes y antisépticos, solo se tomo en cuenta aquellas bacterias que fueron multiresistentes a los antibióticos. Las sustancias antisépticas y desinfectantes utilizadas fueron:

- Fenol
- Yodo 10%.
- Ceticuat<sup>R</sup>. (Cloruro de Benzalconio, Dimetil Bencil, Amonio cuaternario, Alcohol Isopropilico).

La eficiencia microbica de un antiséptico es determinada por el método del coeficiente de fenol (CP).

### 3) Antecedentes.

Existen varios trabajos de investigación que tratan acerca de la posible susceptibilidad o resistencia de las bacterias nosocomiales a sustancias antisépticas y/o desinfectantes. Todos concuerdan en que la eficacia de estas sustancias se afecta de manera directa por la forma en que estas sustancias son preparadas (tipo de diluyente, concentración, etc.) o utilizadas (frecuencia, modo de uso). En la Habana, Cuba, en el Laboratorio Provincial Referencia Control Infecciones Hospitalarias del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología se evaluó la actividad bactericida *in vitro* de cinco soluciones químicas frente a un grupo de microorganismos de referencia, para saber la eficacia de estas soluciones a concentración, solvente y tiempo preconizado por el Manual de Uso para los Procedimientos de Desinfección y Esterilización Hospitalarios vigentes para este país, las cuales eran las siguientes:

- Gluconato de clorhexidina alcohólico al 0.5% w/v en alcohol etílico 86.0% v/v.
- Acetato de clorhexidina alcohólico al 0.5% v/v en alcohol etílico 86.0% v/v.
- Formulación de formalina alcohólica: alcohol al 95.0% v/v, 75 mL; formaldehído (37 a 40%w/v), 2.5 mL; agua destilada estéril, 22.5 mL; NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 g; NaNO<sub>2</sub>, 0.1 g y solución de violeta genciana al 0.15%, 0.1 mL
- Glutaraldehído acuoso al 2% v/v.
- Yodo-povidona 10% en solución acuosa con 1% de yodo disponible.

Se evaluó la eficiencia de sistemas ensayados y la eficacia de las soluciones de glutaraldehído y de formalina como agentes esterilizantes. Se constató el alto nivel de desinfección *in vitro* de la yodo-povidona y de las soluciones de gluconato y acetato de clorhexidina en solución alcohólica, utilizándose las normas AFNOR NF-T-72- 150, vigentes en su medio <sup>(3)</sup>. Según otro estudio realizado en Trinidad se comprobó que la forma de preparación de las soluciones desinfectantes y antisépticos influyen en la actividad biocida que estas presenten frente a las bacterias <sup>(2)</sup>.

En el “Centro de seguridad de alimentos y departamento de ciencia y tecnología alimentaría” en la Universidad de Georgia, Estados Unidos, se evaluó la efectividad bactericida de 13 soluciones antisépticas (derivados de amonio cuaternario, alcoholes, fenoles y combinados) sobre *Enterobacter sakazakii*. El estudio se realizó con las

bacterias en suspensiones sobre superficies, habiendo comprobado, que los niveles de resistencia de la bacteria variaban dependiendo de la composición del desinfectante, la cantidad y el tiempo de exposición <sup>(19)</sup>.

Un estudio llevado a cabo en el Hospital Nacional San Rafael durante el año 2007 <sup>(11)</sup>, en el cual se tomaron muestras de pacientes con heridas operatorias infectadas realizándose cultivos para identificar las bacterias aisladas y analizar su sensibilidad al cuadro básico de antibióticos del hospital, se encontró que de 38 cepas aisladas 72 % Bacilos Gram negativos, 28 % cocos Gram positivos. El 18 % de los pacientes presentaron ambos grupos bacterianos. De los bacilos Gram negativos el 76 % fue *E. coli*. De las Gram positivas el 45 % *S. aureus*. Del total de bacterias aisladas 81 % fue resistente al Trimetroprim Sulfa. Un 70 % a amoxicilina y 42 % a ciprofloxacina por lo que esta investigación confirma la presencia de patógenos con múltiple resistencia antibiótica en el ambiente hospitalario.

Estos hallazgos evidencian la necesidad de establecer, si la fuente de infección es el aire y los objetos inanimados de las salas de operación, así como también determinar si la población bacteriana es resistente a los antisépticos y desinfectantes utilizados en el hospital.

#### 4) Justificación

Las infecciones nosocomiales, dentro de las cuales se encuentran las ISO, constituyen un serio problema para la salud pública a nivel mundial sumando aproximadamente 2 millones de infecciones, 90,000 muertes innecesarias y \$ 4.5 billones gastos para la salud por año en Estados Unidos <sup>(4)</sup>. Según estudios realizados en este mismo país mejorar el ambiente de sala de operaciones es necesario para minimizar la prevalencia de ISO <sup>(4)</sup>, de hecho, la Incidencia de infecciones para artroplastias se han relacionado con el nivel de contaminación del ambiente dentro de los quirófanos. <sup>(21)</sup>. Se ha demostrado que la cuenta microbiológica de una sala de operaciones desocupada, aumenta significativamente cuando la puerta de esta se deja entre abierta con el pasillo. Otro factor que influye grandemente es la adecuada preparación del sitio quirúrgico, siempre y cuando se utilice un agente antiséptico. A pesar que estos agentes disminuyen inmediatamente la cuenta bacteriana, los folículos pilosos impiden una completa esterilización <sup>(21)</sup>.

Según los estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con mas alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos. Esto debido a diversos factores tanto sociales como culturales, dentro de los que podemos mencionar: el uso indiscriminado de antibióticos, la venta y adquisición de medicamentos antimicrobianos sin control, el mal uso de antibióticos por parte de médicos o el cumplimiento inadecuado de la antibiótico terapia por parte del paciente <sup>(1)</sup>, además de recursos limitados en los hospitales.

Estudios previos como el de infecciones nosocomiales, España(18), clínica Mayo, Estados Unidos, Rodríguez y col.(3), y el de ISO, en el HNSR, El Salvador (4) relatan acerca de que las bacterias nosocomiales son resistentes a múltiples antibióticos, pero pocos que describen si estas bacterias presentan algún tipo de resistencia a desinfectantes y/o antisépticos empleados para su erradicación. El estudio de James y col. demuestra la presencia en un 76 % de *Staphylococcus coagulasa* negativo en instrumentos quirúrgicos, teóricamente estériles. <sup>(21)</sup> Esta contaminación dificulta la prevención de posibles infecciones nosocomiales. Esto ocurre no solo por la utilización de antisépticos y desinfectantes inadecuados, si no también por la mala preparación de estos o la simple resistencia intrínseca o adquirida de estas bacterias.

La finalidad de este estudio, fue comprobar la presencia de bacterias aeróbicas potencialmente patógenas en el servicio de sala de operaciones, aislarlas, para determinar si poseen multiresistencia, para luego establecer si las cepas multiresistentes son o no resistentes a las sustancias utilizadas comúnmente como antisépticos o desinfectantes. Con esto se beneficiará al hospital determinando posibles focos de infección, lo cual ayudará a establecer normas para una mejor selección de antisépticos y desinfectantes, incidiendo así, en la prevención de infecciones nosocomiales adquiridas del ambiente, por consiguiente se beneficiara al paciente, disminuyendo su estancia intrahospitalaria y favoreciendo su rápida incorporación a la vida cotidiana. El conocimiento de las deficiencias en el manejo de ambientes contaminados <sup>(21)</sup>, permitirá plantear estrategias mas efectivas en la prevención de las infecciones nosocomiales.

## **5) Marco Teórico.**

### **5.1) Introducción**

La herida quirúrgica es una entidad que acompaña a más del 50% de los pacientes hospitalizados. Sus complicaciones son principalmente: la dehiscencia, la infección y los defectos de la cicatrización <sup>(17)</sup>. La infección del sitio operatorio (ISO) es la infección nosocomial que ocupa entre el primer y segundo lugar en frecuencia en los hospitales del mundo, según las características de estos. La tasa global de ISO en los hospitales de EE.UU. oscila entre el 3 y 5% <sup>(17)</sup>, aunque puede variar notablemente según el tipo de hospital. En El Salvador la tasa de ISO es de 4.5% <sup>(4)</sup>. A pesar de los importantes adelantos en el campo de la infección quirúrgica así como en el conocimiento del proceso de cicatrización, es un problema que se sigue presentando; convirtiéndose en un desafío terapéutico que hace necesaria la utilización de antibióticos nuevos y cada vez más potentes <sup>(17)</sup>.

Las ISO se definen como la infección de cualquiera de los sitios en donde se genera una herida durante el procedimiento quirúrgico, e inclusive heridas superficiales y profundas. Las ISO se puede clasificar en 3 tipos según su localización: Infección incisional superficial (60-80%), infección incisional profunda, infección de órgano o espacio de sitio quirúrgico <sup>(17)</sup>.

En ellas intervienen factores intrínsecos relacionados con el paciente como desnutrición, edad avanzada, enfermedades asociadas, obesidad, inmunosupresión, falla orgánica crónica, hipoperfusión tisular, catéteres invasores. Los cuales en las cirugías de emergencia no pueden ser modificados por el cirujano y factores extrínsecos o del medio ambiente como lavado quirúrgico, vestido quirúrgico, duración del procedimiento, ventilación instrumental, antisepsia de la piel, antibióticos profilácticos, esterilización, presencia de cuerpo extraño, microflora exógena, técnica quirúrgica. Estos últimos pueden ser modificados por el personal de salud y en los que se ha visto que los antibióticos y antisépticos, juegan un papel muy importante en disminuir la incidencia de dichas infecciones <sup>(18)</sup>. El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes. Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples

mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) expresen estrategias inherentes y desarrollen nuevos mecanismos, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos. En relación a esto, se calcula que más de 50% de las prescripciones médicas de antibióticos en los hospitales, se ordenan sin pruebas claras de infección o sin una indicación médica adecuada. <sup>(1)</sup>

Entre las actividades que el personal de salud puede y debe aplicar para disminuir la incidencia de las ISO se encuentran: la limpieza, la descontaminación, la desinfección y esterilización (ver Glosario).

La resistencia que ejercen las bacterias, a sustancias utilizadas para disminuir la incidencia de infecciones nosocomiales, es un problema serio para la salud pública. América Latina se encuentra entre las regiones con alta incidencia <sup>(1)</sup>.

## **5.2) Antisépticos y desinfectantes.**

En servicios de emergencias o Sala de operaciones, se ha descrito que las bacterias han sido expuestas de forma repetitiva a sustancias antisépticas y desinfectantes, entre los cuales se encuentran: alcoholes, fenoles, cloro y compuestos de cloro, formaldehído, glutaraldehído, peróxido de hidrógeno, amonios cuaternarios y otros componentes. Cada uno de ellos con mecanismos de acción y actividad microbicida diferente, enfatizando en los siguientes los cuales se utilizan en el Hospital Nacional San Rafael:

### 5.2.1) Alcohol 70%.

Alcohol etílico y alcohol isopropílico son dos sustancias más bactericidas que bacteriostáticas contra formas bacterianas, también poseen propiedades tuberculocidas, fungicidas y virucidas, pero no destruyen esporas bacterianas. Su actividad bactericida cae drásticamente cuando se diluyen por debajo de concentraciones al 50 %. La concentración bactericida óptima se encuentra en el rango de 60-90 % de soluciones a base de agua <sup>(8,14)</sup>.

Mecanismo de acción: El mecanismo de acción del alcohol radica en la desnaturalización de proteínas. Esto es evidente al observar que ese efecto

desnaturalizante de proteínas es más rápido al utilizar alcohol etílico combinado con agua. También se conoce que algunos alcoholes poseen acción bacteriostática evidente al inhibir la producción de metabolitos esenciales para la división celular.

Actividad Microbiocida: etanol posee la propiedad bactericida más débil de todos los alcoholes, y a pesar de ello todavía es utilizado en algunos centros hospitalarios. Morton examinó la propiedad bactericida de varios microorganismos a esta sustancia, en distintas concentraciones y por distintos periodos de exposición. Variando desde 10 segundos hasta 1 hora. <sup>(8)</sup> Encontrando que *P. aeruginosa* fue eliminada en 10 segundos por todas las concentraciones de etanol de 30 a 100 %. Mientras que *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Salmonella typhi* fueron eliminadas en 10 segundos por concentraciones entre 40 y 100 %. Los organismos Gram positivos. *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron un poco más resistentes, fueron eliminados en el mismo periodo de tiempo a las concentraciones de 60 a 80 %. El isopropanolol tiene mayor actividad bactericida que el etanol para *E. coli* y *S. aureus*. En concentraciones de 60 - 80 % es un potente virucida. <sup>(8)</sup>.

### 5.2.3) Yodo 10%

Es un eficaz bactericida, pero con bastantes inconvenientes tales como precipitación en presencia de proteínas, produce manchas en ropa y piel, es irritante y alergénico y puede retrasar la formación de cicatriz en heridas, sobre todo si se aplica de forma continuada.

Mecanismo de acción: Realiza su acción por medio de varias reducciones Oxidantes, y precipitan proteínas bacterianas y ácidos nucleicos. Altera las membranas celulares al unirse a los enlaces C=C de los ácidos grasos, pero este mecanismo de acción es más complejo que en otros halógenos ya que la formación de ácido hipoyodoso ocurre a temperatura ambiente a velocidad considerable, mientras que los demás halógenos requieren altas temperaturas. Además se forman iones triyodo e incluso pentayodo que incrementan el poder germicida, aunque su concentración sea muy baja. Es muy activo contra todos los microorganismos (bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, micobacterias, virus e, incluso, esporas) <sup>(8)</sup>.

Utilización Tintura de yodo: solución alcohólica de yodo al 2.7%

#### 5.2.4) Fenoles.

El antiséptico y desinfectante estándar con el que se ha comparado la actividad de otros biocidas (coeficiente fenólico). Induce una alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, lo que produce una progresiva salida de constituyentes intracelulares y si aumenta la concentración se provoca la lisis y la destrucción microbiana <sup>(8)</sup>.

Los fenoles poseen actividad bacteriostática o bactericida, fungicida y virucida, pero, en general, no esporicida.

Es bacteriostático fundamentalmente contra bacterias Gram positivas, pero escasos efectos sobre Gram negativas y esporas. Su eficacia disminuye en presencia de materia orgánica. Puede utilizarse unido a jabones a una concentración entre 0.23 a 3 % en el lavado quirúrgico de las manos. Tiene un efecto remanente, ya que se acumula en la capa córnea de la piel y se libera lentamente <sup>(8)</sup>.

Presenta una toxicidad importante sobre todo en el neonato. Se absorbe afectando al SNC, produciendo irritabilidad, temblor, nistagmus, letargia, convulsiones y, en algunos casos, la muerte. Se ha podido demostrar en necropsias degeneración esponjosa de la sustancia blanca. Por ello se ha retirado de las fórmulas comerciales en Medicina. Será utilizado únicamente para calcular el coeficiente de fenol.

#### 5.2.5) Derivados del amonio cuaternario.

Son solubles en agua y alcohol. La presencia de cualquier residuo proteico anula su efectividad. Fueron eliminados como soluciones antisépticas de piel y tejidos por el CDC en 1983, debido a la detección de varios brotes de infecciones por contaminaciones del producto durante su uso. Actualmente se consideran unos buenos agentes limpiadores y sus indicaciones van dirigidas al saneamiento ambiental de mobiliario, paredes, suelos y superficies.

Mecanismo de acción: la acción microbicida se atribuye a la entrada a través de la pared y membrana celular e inactivación de enzimas, mediante rotura de esas barreras y desnaturalización, en el citoplasma, de proteínas esenciales para el microorganismo.

Propiedades antimicrobianas: a concentraciones medias, 10 a 50 ppm, son bactericidas, tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas, con evidencia de mayor acción sobre estas últimas, son fungicidas y virucidas, actuando sobre virus lipofílicos pero no sobre los hidrofílicos. No tienen acción tuberculicida ni esporicida. Su actividad se desarrolla tanto sobre medio ácido como alcalino, aunque en este último muestran mejores resultados. Recientemente se han publicado trabajos en los que se observa una eficaz actividad antiviral, tanto lipo como hidrofílica, a concentraciones de 1:128 aún en presencia de sangre.

### **5.3) Resistencia a antisépticos y/o desinfectantes.**

De forma paralela a la resistencia desarrollada a los antibióticos, las bacterias han creado mecanismos de resistencia a los desinfectantes y antisépticos para poder sobrevivir a su acción. Esta resistencia se clasifican como: propiedad natural de un organismo (intrínseca), adquirida por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) y transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, cassettes de ADN transmisibles). Los genes de resistencia presentes en plásmidos, se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de las bacterias susceptibles y también en los genes que les proveen protección contra otras bacterias. La resistencia intrínseca se ha demostrado para bacterias Gram negativas, esporas bacterianas, micobacterias y bajo ciertas condiciones en especies del género *Staphylococcus* <sup>(8)</sup>.

Las bacterias Gram negativas por lo general son más resistentes a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas. *Pseudomonas aeruginosa* es más resistente a la mayoría de estos agentes, incluyendo la clorhexidina. La membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos sin relación química. Las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Además de las vías antes descritas se ha propuesto una tercera vía para agentes catiónicos como los CAC, biguanidas y diamidinas, los cuales dañan la membrana y facilitan su autocaptación. Un ejemplo claro de resistencia mediada por la membrana externa es el de *P. aeruginosa* que presenta diferencias en la composición del lipopolisacárido (LPS) y el contenido de cationes como el magnesio, que produce enlaces estables entre moléculas de LPS y como

complemento a este mecanismo, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias <sup>(8)</sup>.

La presencia de un LPS menos ácido en la membrana externa puede ser un factor que contribuye a la resistencia intrínseca, esta es una característica de bacterias como la *P. aeruginosa* <sup>(8)</sup>.

La exposición repetitiva a los agentes químicos puede ser fuente de resistencia a los propios agentes. El mecanismo de resistencia en desinfectantes puede conllevar a resistencia a antibióticos <sup>(1)</sup>.

#### **5.4) Resistencia bacteriana antibióticos.**

Las bacterias aeróbicas juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones nosocomiales. Entre ellas las ISO que representan cerca del 91 % <sup>(18)</sup> de los casos. Si las bacterias aisladas son resistentes a los antibióticos, ello obliga al médico a la utilización de antibióticos de amplio espectro o de nuevas generaciones, contribuyendo al desarrollo por parte de la bacteria, de múltiples mecanismos de resistencia para sobrevivir a su actividad, algunos ejemplos de mecanismos de intercambio de resistencia bacteriana son:

Transducción que es la transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano pero se conserva el genoma viral se habla de transducción especializada. Ciertos Antibióticos están particularmente afectados por este mecanismo:  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas; cloranfenicol, sulfamidas (Ejemplo: Resistencia a la ampicilina *E. coli* y del *Proteus mirabilis*).

Conjugación: Transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de un pili sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que confieren resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes.

Transformación: Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma.

Transposición: Movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular <sup>(1)</sup>.

Los genes de resistencia pueden expresarse en 5 formas:

Modificación enzimática o destrucción del antibiótico.

Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos).

El ejemplo más representativo es el de betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Se reconocen cuatro clases de betalactamasas: Clase A: penicilinasas, Clase B: betalactamasas, Clase C: cefalosporinasas, Clase D: oxacilinasas <sup>(1)</sup>. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglicósidos. Se sabe que hay tres tipos de modificaciones catalizadas por O-fosfotransferasas (OPH), Oadeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) que inactivan estos medicamentos <sup>(1)</sup>.

Impermeabilidad al antibiótico. Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglicano. Además de una capa pequeña de peptidoglicano en las bacterias gramnegativas, se conoce una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas (OMP) Estas funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico influyen en la permeabilidad a los antibióticos, su número y tamaño genera diversos tipos de resistencia al paso del antibiótico a través de la membrana (Ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a la imipenem) <sup>(1)</sup>.

Alteración o producción de nuevos sitios blanco.

Los cambios en los sitios blanco del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos que se usan en clínica, pues evitan el efecto bactericida/bacteriostático, lo cual estimula el desarrollo de resistencia. Por ejemplo, el

mecanismo más común de resistencia a macrólidos (eritromicina) por bacterias Gram negativas, implica la modificación del sitio blanco en el ribosoma, específicamente la metilación de un residuo de adenina en el dominio V del ARNr23S60. La resistencia a fluoroquinolonas es otro ejemplo donde se atribuye a los efectos debidos a la mutación que afectan los sitios blanco, ADN girasa y topoisomerasa en las *enterobacterias* <sup>(1)</sup>.

Sobre-expresión del sitio blanco.

Solo ha sido descrito en aislados clínicos de micobacterias. La duplicación génica o las mutaciones de los promotores implicados en la transcripción de estos genes, son probablemente el mecanismo responsable. La hiper-producción de betalactamasas induce resistencia al clavulanato y se podría considerar la sobreexpresión del blanco del antibiótico <sup>(1)</sup>.

Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico.

El mecanismo de eflujo para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias Gram positivas y Gram negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas, que son mediados por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos. Ejemplo: *Staphylococcus* resistentes a las tetraciclinas. <sup>(1)</sup>.

En los últimos años, se ha desarrollado un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada, tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos, ya que, el mecanismo de resistencia es transmitido por formas similares, por ejemplo por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones <sup>(1)</sup>.

Todo lo anterior, muestra la compleja problemática de la existencia bacteriana, y refleja la importancia de hacer un diagnóstico del problema, en especial en lo relativo a la actividad de los desinfectantes y antisépticos de uso hospitalario, ya que estos constituyen una de las herramientas más valiosas en la prevención de las infecciones nosocomiales.

## 6) Variables.

<b>VARIABLES</b>	<b>TIPO VARIABLE</b>	<b>DEFINICION OPERACIONAL</b>	<b>INDICADOR (unidad de medida).</b>
<b>Bacteria aeróbica nosocomial</b>	Cualitativas	Bacteria aeróbica de ambiente hospitalario.	Presencia o ausencia.
<b>Gram Reacción y morfología.</b>	Cualitativa	Coloración según técnica de Gram, morfología, agrupación.	Gram positivo o Gram negativo. Cocos o Bacilos.
<b>Susceptibilidad a antibióticos</b>	Cualitativa	Interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición.	Sensible o resistente
<b>Multiresistencia</b>	Cualitativas	Microorganismos que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos habitualmente empleados en el tratamiento de las infecciones por el microorganismo considerado <sup>(15)(31)</sup> .	Resistente a mas de 2 antibióticos del estudio por el método de Kirby-Baur.
<b>Coefficiente de fenol</b>	Cuantitativo.	División en relación al fenol de la dilución mayor del desinfectante que mata a todos los microorganismos después de 10 minutos de incubación	Crecimiento bacteriano demostrado por la presencia o ausencia de turbidez en el medio.

<b>Concentración inhibitoria mínima utilizada del antiséptico.</b>	Cuantitativa	Dilución mínima a la cual el antiséptico en prueba inhibe el crecimiento bacteriano utilizando una dilución menor y mayor a la recomendada por el fabricante	Porcentaje de dilución.
<b>Tiempo estandarizado de exposición a desinfectantes y antisépticos.</b>	Cuantitativa	Periodo de tiempo el cual el antiséptico y/o desinfectante esta en contacto con la bacteria estudiada.	5, 10, y 15 min.
<b>Frecuencia de aislamiento</b>	Cuantitativa	Intervalo de tiempo con el cual se colectaran las muestras	Diferentes días de la semana a diferentes horas.
<b>Sitio</b>	Cualitativa	Lugar de donde se colecte la bacteria.	Nombre de sala de operaciones, mesa, aire, paredes, etc.

## **7) Objetivos.**

### **7.1) Objetivo General:**

- Determinar la presencia de bacterias aeróbicas nosocomiales multiresistentes en muestras ambientales, la susceptibilidad a antisépticos y desinfectantes utilizados en salas de operaciones del hospital San Rafael.

### **7.2) Objetivos Específicos:**

- Determinar la presencia en muestras ambientales, de bacterias aeróbicas nosocomiales potencialmente patógenas en la sala de operaciones del hospital Nacional San Rafael.
- Determinar si las bacterias aisladas son sensibles o resistentes a los antibióticos seleccionados.
- Determinar la prevalencia de bacterias multiresistentes a los antibióticos en la población bacteriana.
- Determinar de las bacterias aeróbicas nosocomiales multiresistentes aisladas, la susceptibilidad frente a los antisépticos seleccionados.
- Determinar de las bacterias aeróbicas nosocomiales multiresistentes aisladas, la susceptibilidad frente a los desinfectantes seleccionados.
- Determinar la bacteria aeróbica multiresistentes más frecuentemente aislada y su sitio de aislamiento.
- Comparar si las bacterias aeróbicas nosocomiales aisladas son similares en las descritas en estudios anteriormente realizado en el Hospital San Rafael.

## **8) Metodología.**

### **8.1) Periodo de Estudio.**

La investigación se realizó entre los meses de Septiembre a Diciembre del año 2008.

### **8.2) Tipo de estudio:**

El estudio es de tipo descriptivo, observacional y prospectivo.

### **8.3) Población y muestra.**

Todas las bacterias aeróbicas ambientales mutiresistentes aisladas en las salas de operaciones del Hospital Nacional San Rafael.

### **8.4) Criterios de inclusión y exclusión.**

#### **8.4.1) Inclusión:**

- Bacterias aeróbicas nosocomiales, potencialmente patógenas, que presenten resistencia múltiple a los antibióticos previamente establecidos para cada genero y especie (ANEXO), aisladas de muestras de sala de operaciones del Hospital Nacional San Rafael, en los sitios definidos en el protocolo de estudio.

#### **8.4.2) Exclusión.**

- Cualquier tipo de crecimiento micótico.
- Bacterias aeróbicas nosocomiales que no presenten multiresistencia.

### **8.5) Procedimientos para recolección y análisis de los datos.**

#### **8.5.1) Muestreo**

Se realizo un muestreo mixto de conveniencia y al azar, por que el equipo de investigación determinó el número de muestras a tomar durante las 8 semanas de estudio, al azar por que se tomaron muestras todos los días de la semana (Lunes a Domingo) y a cualquier hora del día, siendo de 7 a 3 pm muestreo de planta, de 4 a 6 am y fines de semana muestreo de turno. El numero de muestras de aire se estableció de acuerdo a formulas estandarizadas conforme a la raíz cúbica del volumen total de la sala <sup>(13)</sup>. Se tomo una muestra de cada uno de los siguientes, lámpara quirúrgica, cauterio, mesa de anestesia y mesa quirúrgica, seleccionando de forma aleatoria el lugar preciso de la toma de muestra, considerando que, si era tomada en horario de planta se tomaban

muestras de 3 salas de operación, y si era horario de turno se tomaban muestras de 2 salas de operación (ver Grafica 1).

### **8.5.2) Técnicas de recolección de la muestra:**

Las muestras se obtuvieron en el servicio de sala de operaciones del Hospital Nacional San Rafael, estas muestras se tomaron exclusivamente en los 5 quirófanos disponibles, 3 de planta y 2 de turno. Estas salas fueron visitadas a distintas horas laborales, durante la mañana y tarde, noche (ver 8.5.1 muestreo) y se tomaron de muestras de diferentes superficies.

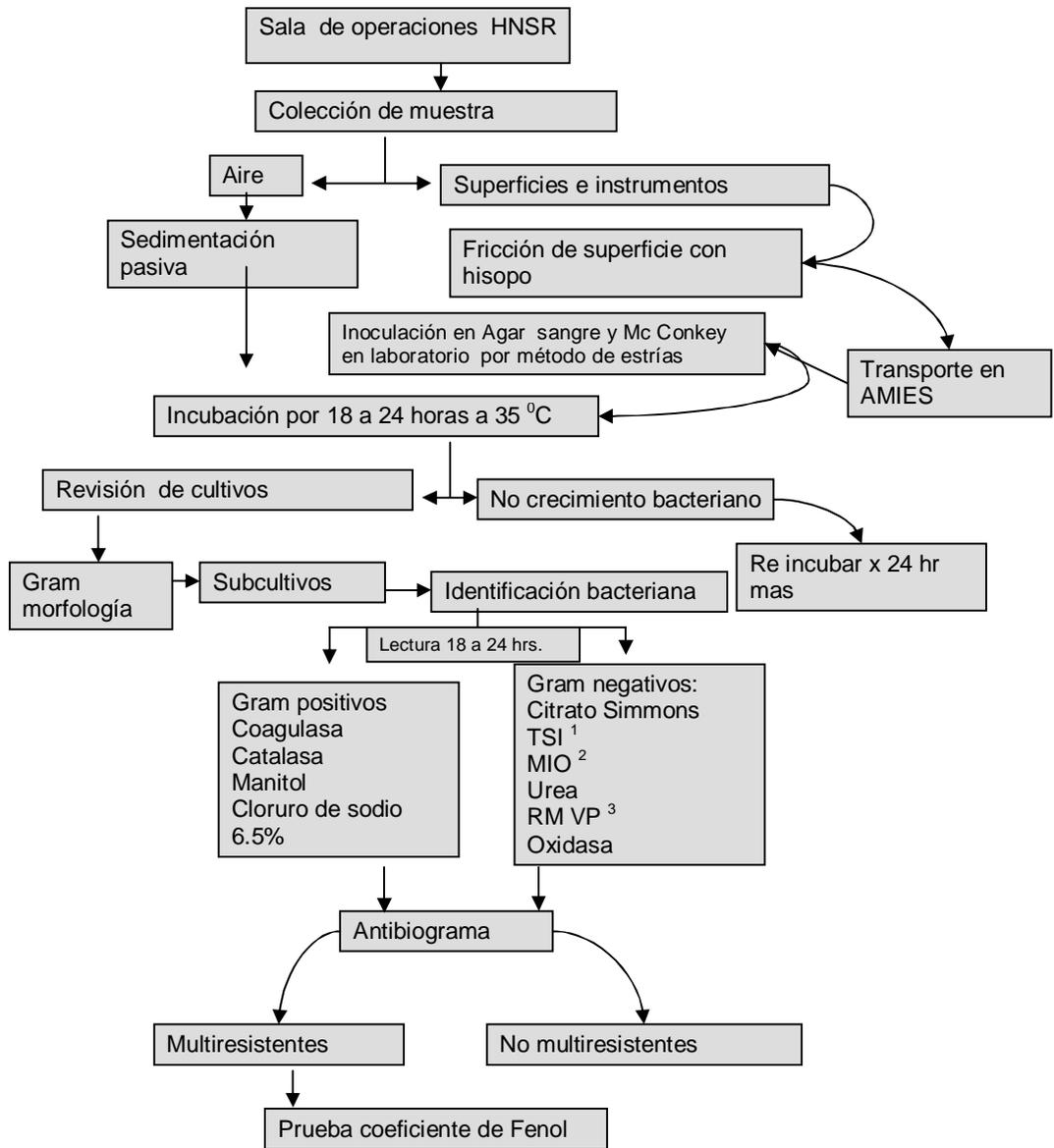
Para la colección de muestras de aire Se utilizó el método llamado “sedimentación pasiva”<sup>(13)</sup> (Glosario), con un total de numero de muestras que dependió de el tamaño de las salas de acuerdo a formulas establecidas<sup>(13)</sup>.

Las muestras de superficies e instrumentos de sala operaciones (mesa quirúrgica y anestésica, lámpara quirúrgica, cauterio) se obtuvieron por fricción de superficie, humedeciendo un hisopo estéril con solución salina estéril al 0.85%, se frota la superficie del instrumento y luego se coloca en un medio de transporte, que en este caso fue el medio de transporte AMIES, previamente identificado. Este procedimiento se repitió en varias ocasiones, en distintos días de la semana durante un periodo de 8 semanas.

### **8.5.3) Procesamiento de muestras.**

Toda muestra ingresó al laboratorio de microbiología de la Universidad Dr. José Matías Delgado de forma inmediata. Las muestras obtenidas del ambiente por medio de sedimentación pasiva se incubaron en la estufa, y la de las superficies e instrumentos obtenidos por fricción de superficie se inocularon por el método de estrías en el medio Mac Conkey y Agar Sangre incubándose por 18 a 24 horas a 35 °C. Posteriormente se observaron dichos cultivos, anotando el número y características de las colonias aisladas. Se realizaron frotis de cada tipo de colonia y se colorearon por la técnica Gram. En los casos en los que se observo crecimiento bacteriano, las placas de cultivo se reincubaron por 24 horas mas. (Grafica 2)

**Grafica 2: Flujograma de la recolección y análisis de las muestras.**



1: Triple Azúcar y Hierro, 2: Movilidad Indol Ornitina, 3: Rojo de Metilo- Vogues Proskaver

Después de realizar el aislamiento, a través, de subcultivos de las posibles bacterias aeróbicas patógenas, se procedió a la identificación bacteriana mediante pruebas

específicas, las bacterias Gram negativas por medio de las pruebas bioquímicas de: citrato de Simmons, TSI, MIO, Urea y Rojo de metilo-Voges Proskauer. Para las Gram positivas las pruebas de catalasa, coagulasa, manitol y la prueba de cloruro de sodio saturado al 6.5 %. (Grafico 1)

Luego se realizó prueba de antibiograma según técnica de Kirby Bauer (glosario) a partir de los aislamientos previamente identificados. Posteriormente a la incubación se midió en milímetros el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano y se interpretaron los resultados utilizando las tablas NCCLS específicas para ello <sup>(11)</sup>.

En las bacterias resistentes a 2 o más de los grupos de antibióticos se estudio la prueba de sensibilidad a antisépticos/desinfectante, se realizó por medio de la prueba estandarizada del coeficiente de fenol, dividiendo las concentraciones inhibitorias encontradas sobre las concentraciones inhibitorias del fenol y se reportaron los resultados (ver Glosario) (ver nota 1).

## **8.6) Técnicas utilizadas.**

### **8.6.1) Prueba de susceptibilidad (antibiograma según técnica Kirby Bauer)<sup>1</sup>**

El antibiograma es una técnica que permite determinar in vitro la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. La sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico, permitiendo al medico escoger el antibiótico mas adecuado con base científica proporcionada por el laboratorio y dar tratamientos efectivos <sup>(10)(11)</sup>.

Se interpreta:

Sensible: esta categoría implica que una infección dada por la bacteria en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis del antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones <sup>(20)</sup>.

1) Nota: las técnicas (bioquímicas, antibiograma y coeficiente de fenol) se validaron utilizando las cepas de referencia *E. coli* ATCC <sup>R</sup>. 25922, que para el antibiograma según la técnica Kirby-Bauer y el coeficiente de fenol fue sensible a todos los antibióticos y desinfectantes utilizados, por lo cual, nos garantiza la precisión y exactitud de nuestra prueba <sup>(20)</sup>.

Resistente: las bacterias resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (ejemplo betalactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada <sup>(20)</sup>.

Intermedio(ver nota 1): esta categoría incluye bacterias que pueden ser inhibidas por concentraciones de antibiótico mas elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas o que sean concentradas fisiológicamente en el tejido infectado <sup>(20)</sup>.

### **8.6.2) Prueba de sensibilidad a Antisépticos y desinfectantes (Coeficiente de fenol).**

E coeficiente de fenol es una prueba que nos permite determinar la efectividad antimicrobiana de sustancias antisépticas o desinfectantes frente al fenol. Para realizarlo se utilizó las cepas multiresistentes del estudio, además de una cepa control (ver nota 2). Previo a realizar la prueba descrita según la literatura consultada <sup>(12)</sup> se decidió hacer un ensayo utilizando los desinfectantes y antisépticos puros (100%) y la recomendación del fabricante, obteniendo así, una concentración mayor y una menor(ver glosario). El volumen final de estas diluciones fue de 5 ml. por tubo. Se identificaron 18 tubos con caldo de tripticasa soya (TSB) con el nombre y dilución de desinfectante, y el intervalo de tiempo en el que se hizo el subcultivo. Se ubicaron en orden y se colocaron un tubo para cada diferente dilución, tanto de antiséptico como fenol y para cada intervalo de tiempo. Se agregó a cada tubo 0.5 ml. del caldo de tripticasa soya con bacteria cultivadas hasta la fase exponencial (20 horas), se mezclo para obtener una suspensión homogénea y luego utilizando una técnica aséptica a un intervalo de 5, 10 y 15 minutos se transfirió

---

1) Nota: Debido a que se utilizaran discos con antibióticos a concentraciones estandarizadas esta categoría no será tomada en cuenta para el estudio, y las bacterias que se encuentren en esta categoría serán reportadas como resistente.

2) Nota: las técnicas (bioquímicas, antibiograma y coeficiente de fenol) se validaron utilizando las cepas de referencia *E. coli* ATCC <sup>R</sup>. 25922, que para el antibiograma según la técnica Kirby-Bauer y el coeficiente de fenol fue sensible a todos los antibióticos y desinfectantes utilizados, por lo cual, nos garantiza la precisión y exactitud de nuestra prueba <sup>(20)</sup>.

el contenido de una asa estandarizada (10 $\mu$ ) de cada uno de los tubos con desinfectantes a los tubos que contienen TSB, previamente identificados. Se incuban por 18-24 horas a 35°C.

Posteriormente se observó la presencia o ausencia turbidez y se calculó el coeficiente de fenol, dividiendo las concentraciones inhibitorias encontradas entre las concentraciones inhibitorias del fenol <sup>(12)</sup>

### **8.7) Procedimiento de análisis de datos.**

Para la tabulación y análisis de resultados se utilizó el programa de base de datos SPSS versión 16.0 y Excel. Los datos estadísticos se presentaron en tablas, graficas de barra y de pastel para su mejor interpretación.

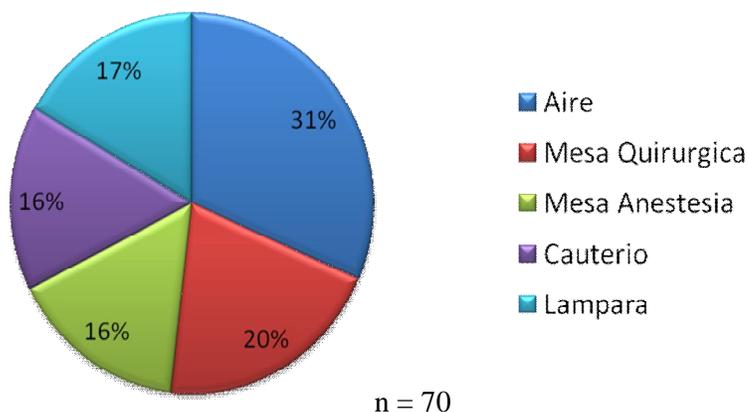
## 9) Resultados.

El estudio se realizó entre los meses de octubre y diciembre del año 2008, en un periodo de 8 semanas. Se recolectaron y procesaron en el laboratorio de Microbiología (UJMD) un total de 104 muestras, 36 (35%) provenientes del aire y 17 (16%) de cada objeto inanimados en estudio (mesa quirúrgica, mesa anestésica, cauterio, lámpara quirúrgica) de las distintas salas del Hospital Nacional San Rafael; de 70 muestras se aislaron bacterias, lo cual corresponde a un 67 % del total (ver grafica 3).



Los aislamientos más frecuentes provinieron del aire, 22 muestras (31%), 14 (20%) muestras obtenidas de las mesas quirúrgicas, 12 (17%) obtenidas de la lámpara quirúrgica, 11 (16%) de la mesa anestésica, y 11 (16%) del cauterio (aclarando que se interpreta como cauterio a su mesa, mangueras y demás partes del aparato), la mesa anestésica y el cauterio fueron los sitios de donde menos bacterias fueron aisladas (ver grafica 4).

**GRAFICA 4: ORIGEN DE LAS BACTERIAS  
AEROBICAS AISLADAS**

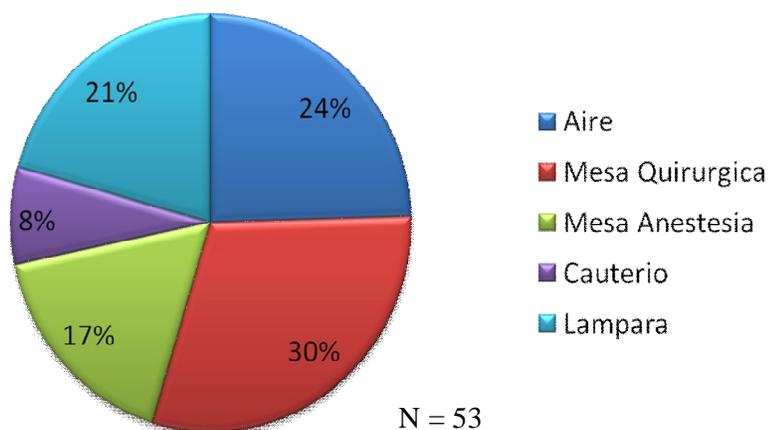


Del total de muestras se aislaron 145 cepas bacterianas. De ellas 53 (37%) se clasificaron como potencialmente patógenas, y 92 (63%) contaminantes ambientales no asociadas a patogenicidad. También se aislaron 4 cepas de levaduras.

Las bacterias potencialmente patógenas se aislaron principalmente de las mesas quirúrgicas, siendo 16 (30 %).

Se aislaron del aire 13 (24%), siendo este sitio el único, de donde se aislaron simultáneamente dos géneros bacterianos potencialmente patógenos distintos (*Staphylococcus spp* y *Complejo Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*). De las lámparas quirúrgicas, mesas anestésica y cauterios se aislaron menos bacterias (Ver grafica 5).

**GRAFICA 5: ORIGEN DE BACTERIAS POTENCIALMENTE PATOGENAS**



No se encontró una relación estadística significativa entre el origen y la bacteria aislada ya que el Chi cuadrado fue de 0.8., pero si se observó que las especies bacterianas poseen un sitio en donde con mayor frecuencia son aisladas (ver cuadro 1)

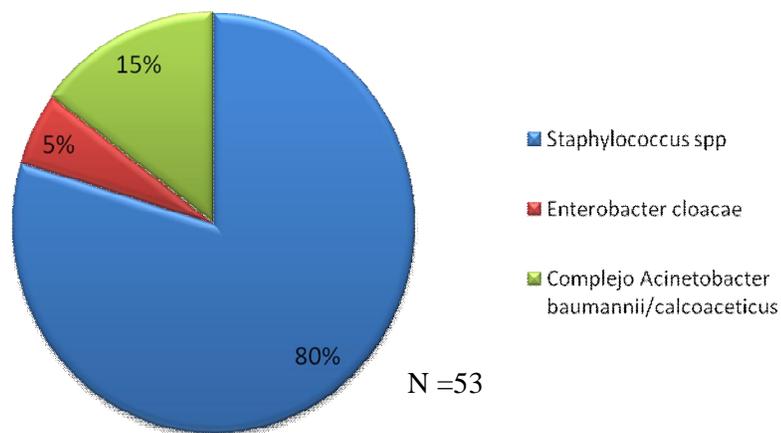
**Cuadro 1: Origen de bacterias aisladas.**

Origen		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	<i>Complejo baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter cloacae</i>	Total
Aire	Frecuencia	1	8	4	0	13
	Porcentaje	12.5%	23.5%	50%	0%	24.5%
Mesa Quirúrgica	Frecuencia	3	12	1	0	16
	Porcentaje	37.5%	35.3%	12.5%	0%	30.2%
Mesa anestesia	Frecuencia	2	6	1	0	9
	Porcentaje	25%	17.6%	12.5%	0%	17%
Cauterio	Frecuencia	0	3	0	1	4
	Porcentaje	0%	8.8%	0%	33.3%	7.5%
Lámpara	Frecuencia	2	5	2	2	11
	Porcentaje	25%	14.7%	25%	66.7%	20.8%
Total	Frecuencia	8	34	8	3	53
	Porcentaje	100%	100%	100%	100%	100%

Los contaminantes ambientales identificados con mayor frecuencia fueron: *Bacillus subtilis*, *Graffkya tetragena* y *Corynebacterium spp.*

Las bacterias potencialmente patógenas aisladas fueron: *Staphylococcus spp*, seguido del complejo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* y *Enterobacter cloacae* (ver grafica 6).

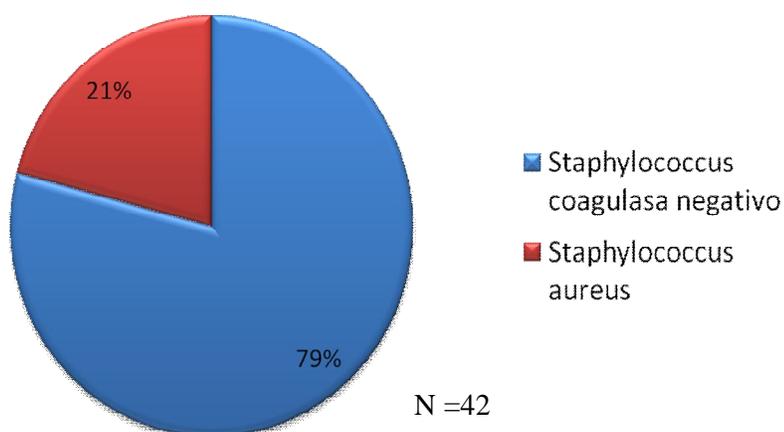
**GRAFICA 6: FRECUENCIA DE BACTERIAS PATOGENAS AMBIENTALES AISLADAS**



Para la identificación de las bacterias, dependiendo de sus características macroscópicas (tamaño, color, superficie) y microscópicas, se realizó la coloración Gram de las bacterias potencialmente patógenas (N=53), 42 (80 %) fueron clasificados como Gram positivas y 11 (20 %) como Gram negativas.

Del total (n=42) de cocos Gram positivos aislados, 42 (100 %) fueron clasificados como del genero de *Staphylococcus*. De ellos 34 (79 %) fueron coagulasa negativo y 8 (21 %) coagulasa positivo clasificado como *Staphylococcus aureus* (ver grafica 7).

**GRAFICA 7: DISTRIBUCION DE STAPHYLOCOCCUS  
SEGÚN ESPECIE**



De las 11 bacterias Gram negativas, 8 (73%) fueron Cocobacilos y 3 (27%) bacilos. Todos fueron estudiados por sus reacciones bioquímicas. Los Cocobacilos Gram negativos seleccionados el 100% pertenece al complejo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* que se presenta como no fermentador de la lactosa, no móvil, oxidasa-negativo y que se agrupa en pares.

Los 3 bacilos Gram negativo que son clasificados como *Enterobacter cloacae* por ser fermentadores de la lactosa, móviles, Oxidasa negativo y Catalasa positivo. Estos fueron aislados 2 (67 %) de la lámpara quirúrgica y 1 (33%) del cauterio.

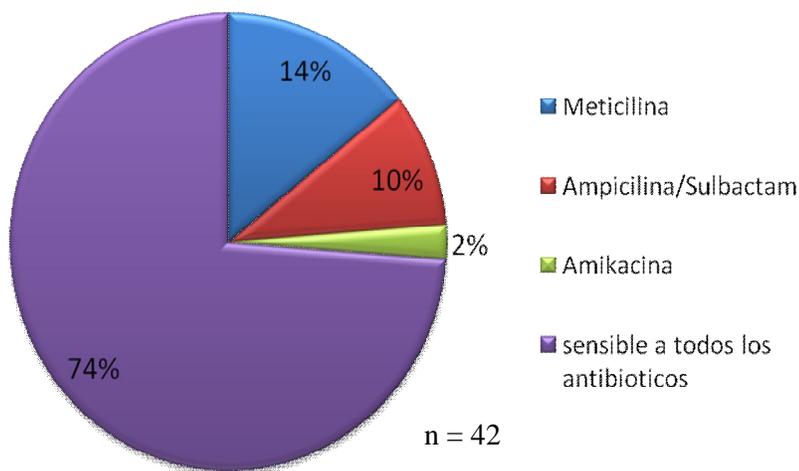
grafico 5

Para medir el patrón de susceptibilidad de las bacterias aeróbicas potencialmente patógenas aisladas, se utilizó el método Kirby-Bauer; se observo que 36 (68%) fueron sensibles a todos los antibióticos probados, 16 (30%) fueron resistentes a 1 solo antibiótico y 1 (2%) bacteria fue multiresistentes es decir, resistente a 2 antibióticos, dicha cepa bacteriana se aisló de una de las lámparas quirúrgicas.

o 6

Del genero *Staphylococcus* aislados (n=42), 31 (74%) fueron sensible a todos los antibióticos evaluados, los restantes fueron sensibles a un antibiótico; de ellos 6 (14 %) presento resistencia a Meticilina, 4 (10 %) presentaron resistencia a Ampicilina/Sulbactam, solamente 1 (2 %) fue resistente a Amikacina y ninguno presento resistencia a Ciprofloxacina e Imipinem (ver grafico 8).

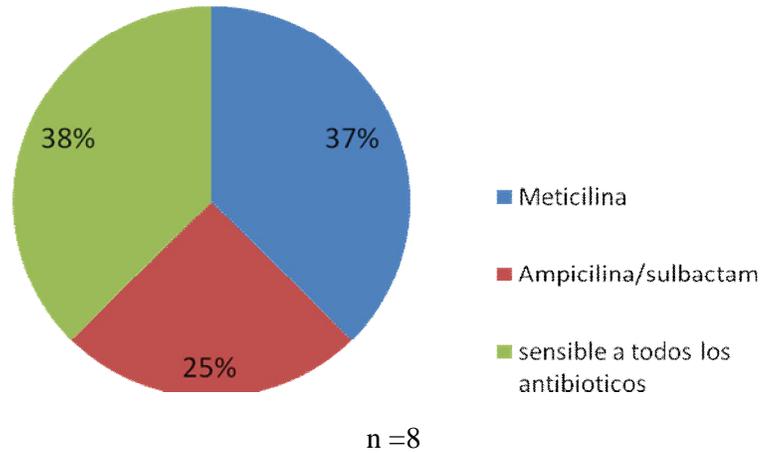
**GRAFICO 8: RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS SPP AISLADOS**



*\*no se reporto resistencia a ciprofloxacina ni a Imipinem por lo cual lo cual no se incluyen en la grafica.*

El total de la cepas de *Staphylococcus aureus* aislados fue 8, de estos 3 (38%) fue sensible a todos los antibióticos, 3 (37%) fue resistente a la Meticilina y 2 (25%) fue resistente a Ampicilina/Sulbactam (ver grafica 9-A).

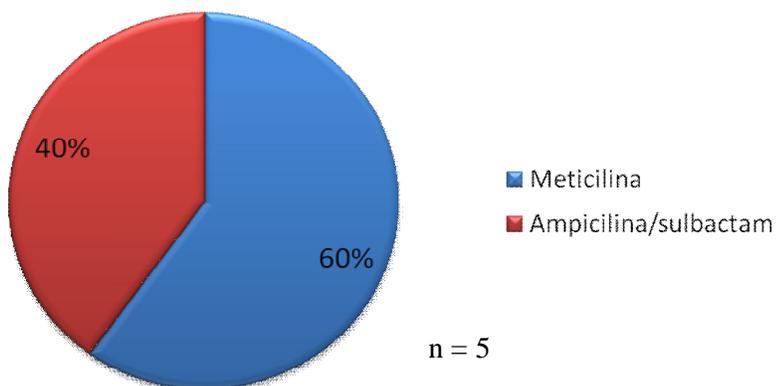
**GRAFICA 9-A: SUSCEPTIBILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADOS**



\*no se reporto resistencia a ciprofloxacina, Imipenem ni a Amikacina por lo cual lo cual no se incluyen en la grafica.

De los 5 (62 %) *Staphylococcus aureus* que presento resistencia a un antibiótico, 3 (60 %) a Metilina y 2 (40 %) restante a Ampicilina/Sulbactam (Ver grafica 9-B).

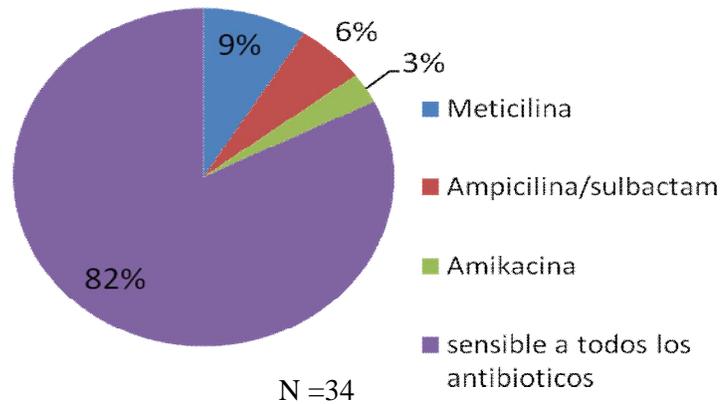
**GRAFICA 9-B :RESISTENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADOS**



\*no se reporto resistencia a ciprofloxacina, Imipenem ni a Amikacina por lo cual lo cual no se incluyen en la grafica.

Por otro lado, de los *Staphylococcus coagulasa negativo* (n=34), 28 (85%) fue sensible a todos los antibióticos evaluados, 3 (9%) presento resistencia a Meticilina y 2 (6%) a Ampicilina/Sulbactam (ver grafica 10-A)

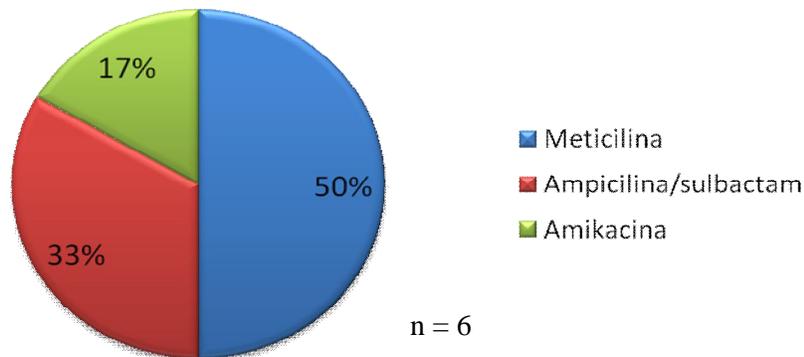
**GRAFICA 10-A: SUSCEPTIBILIDAD DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO AISLADOS**



*\*no se reporto resistencia a ciprofloxacina ni a Imipenem por lo cual lo cual no se incluyen en la grafica.*

Del total de *Staphylococcus coagulasa negativo* que presento resistencia 6 (18 %) presento resistencia a un antibiótico, de ellos, 3 (50 %) fue resistente a Meticilina, 2 (33 %) a Ampicilina/Sulbactam y 1 (17 %) a Amikacina (ver Grafica 10-B)

**GRAFICA 10-B: RESISTENCIA STAPHYLOCOCCUS COAGULASA NEGATIVO AISLADOS**



*\*no se reporto resistencia a ciprofloxacina ni a Imipenem por lo cual lo cual no se incluyen en la grafica.*

**Cuadro 2: Resistencia de Staphylococcus frente a los antibióticos utilizados**

	S. aureus	S. coagulasa negativo	Total	Porcentaje
<b>Ciprofloxacina</b>	0	0	0	0%
<b>Meticilina</b>	3 (37%)	3 (9%)	6	14%
<b>Ampicilina/Sulbactam</b>	2 (25%)	2 (6%)	4	10%
<b>Imipinem</b>	0	0	0	0%
<b>Amikacina</b>	0	1 (3%)	1	2%
<b>Sensible a todos los antibióticos</b>	3 (38%)	28 (82%)	31	74%
<b>Total</b>	8 (100%)	34 (100%)	42	100%

*Nota: todos los S. aureus metilino resistentes y los S. coagulasa negativo, deben informarse como resistentes a todos los CEPHEMS y a los otros Betalactámicos tales como: amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperacilina/tazobactam e Imipinem, independientemente de los resultados in vitro <sup>(20)</sup>.*

El 100 % de *Enterobacter cloacae* (n=3) presentó resistencia a Ceftazidima, y fue sensible a los otros antibióticos estudiados.

En cuanto al complejo *Acinetobacter baumannii/calcoo-ceticus* (n=8), 5 (63%) fue sensible a todos los antibióticos, 2 (25 %) fue resistente a un antibiótico y solamente el 1 (12 %) fue multiresistente. De ellos (n=3) el 75% a Ceftazidima y un 25% restante a Ampicilina/Sulbactam (ver cuadro 2).

**Cuadro 3: Resistencia del complejo Acinetobacter baumannii/calcoo-ceticus a los antibióticos utilizados**

	Numero de bacterias	Resistencia	Porcentaje de resistencia
<b>Ciprofloxacina</b>	0	0	0%
<b>Ampicilina/Sulbactam</b>	1	1	25%
<b>Ceftazidima*</b>	2	3	75%
<b>Imipinem</b>	0	0	0
<b>Amikacina</b>	0	0	0
<b>Total</b>	3	4	100%

\* La bacteria multiresistente fue resistente Ceftazidima y Ampicilina/Sulbactam.

Se determinó el coeficiente de fenol a la cepa de complejo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multiresistente proveniente de una lámpara quirúrgica, para así establecer la sensibilidad o resistencia a los antisépticos utilizados en la piel de los pacientes o los desinfectantes utilizados en sala de operaciones del hospital. Luego de la incubación, todos los tubos presentaron turbidez marcada, por lo que para garantizar la eficiencia de la prueba, se decidió realizar subcultivos de dichas soluciones, utilizando medios no selectivos (agar nutritivo) y comprobando los resultados macroscópicos de turbidez con el crecimiento de colonias luego de 24 horas de incubación (ver cuadro 4).

**Cuadro 4: Resultados Coeficiente de fenol.**

<b>Antiséptico/desinfectante</b>	<i>E. coli</i> ATCC <sup>®</sup> . 25922	<i>Acinetobacter.</i> <i>baumannii/calcoaceticus.</i>
<b>Fenol puro</b>	Sensible	Resistente
<b>Fenol 1/100</b>	Sensible	Resistente
<b>Yodo 1/10 *</b>	Sensible	Resistente
<b>Yodo 1/20</b>	Sensible	Resistente
<b>Ceticuat Puro</b>	Sensible	Sensible
<b>Ceticuat 1/100</b>	Sensible	Resistente

*\*No se utilizó concentraciones puras de yodo, por ser el único antiséptico empleado en la prueba, se utilizó las concentraciones toleradas para su uso cutáneo 10 % yodo activo<sup>(5)</sup>.*

Debido a los resultados de resistencia incluso a preparaciones puras, en los tiempos 5,10 y 15 minutos establecidos por la prueba, se decidió suspender el ensayo con el resto de diluciones. Por lo tanto es imposible calcular el coeficiente de fenol para las sustancias utilizadas; debido a que, ninguna de las diluciones empleadas fue eficiente para erradicar la cepa en estudio durante el transcurso de la prueba, a excepción del Ceticuat® puro, al cual presento sensibilidad.

## 10) Discusión.

Las infecciones nosocomiales dentro de las cuales se encuentran la ISO constituyen un serio problema para la salud pública a nivel mundial <sup>(4)</sup>. Según estudios realizados en países industrializados mejorar el ambiente de sala de operaciones es necesario para minimizar la prevalencia de infecciones nosocomiales <sup>(21)</sup>. América Latina se encuentra entre las regiones con mas alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos <sup>(1)</sup>. Es importante el análisis de la resistencia no solo de antibióticos, si no también a antisépticos y desinfectantes, ya que estos son una de las herramientas mas efectivas utilizadas para prevenir las infecciones nosocomiales.

En este estudio realizado en las salas de operaciones del Hospital Nacional San Rafael, se observo que el ambiente esta contaminado, también por hongos miceliales y levaduras. La mayoría de las bacterias ambientales no tienen potencial patógeno, tal y como lo descrito por Rosa y col. <sup>(24)</sup>, sin embargo, también se encontró un porcentaje significativo de bacterias ambientales potencialmente patógenas, siendo las mas frecuentes los *Staphylococcus*, tanto coagulasa negativo, como *S. aureus*; complejo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* y *Enterobacter cloacae* (ver gráfico 6). Estas bacterias son de suma importancia, debido al surgimiento de enfermedades emergentes en inmunosuprimidos <sup>(39)</sup> y a el papel que ejercen en el desarrollo de infecciones nosocomiales, tal y como fue descrito en Estados Unidos por Richards y col., en donde se relaciona la presencia de las bacterias antes mencionadas en unidades de cuidados intensivos (UCI), con el desarrollo de septicemia, neumonías, infecciones de vías urinarias, ISO e infecciones cardiovasculares <sup>(32)</sup>.

El origen de las bacterias potencialmente patógenas fue diverso, siendo más frecuente la mesa quirúrgica (30%), pudiendo este ser debido al contacto directo que existe con el paciente y los fluidos corporales. El segundo en frecuencia (24%) fue el aire (Ver gráfico 5), ya que aunque carezca de nutrientes, es un vehículo de transporte idóneo, así como ha sido descrito previamente por Charles y col <sup>(23)</sup>. Las bacterias mas frecuentemente aisladas (Ver gráfico 6), fueron cocos Gram positivos pertenecientes al género *Staphylococcus* (80%), los cuales están descritos como parte de la flora normal del personal de sala de operaciones <sup>(23)</sup>, y de ahí pueden pasar al ambiente y contribuir a

la diseminación de las infecciones nosocomiales <sup>(21,23)</sup>. También se encontró el complejo *A. baumannii/calcoaceticus* (15%) que está asociado con brotes de septicemia y neumonía nosocomial en pacientes inmunosuprimidos; este complejo, posee dos características particulares: la capacidad de persistir en el ambiente durante periodos prolongados de tiempo, debido a que puede utilizar varias fuentes de carbono como sustrato, y la otra característica en particular es su multiresistencia a antibióticos, desinfectantes y antisépticos, tal y como lo observamos en este estudio y el estudio realizado por Peleg y col. <sup>(30)</sup>.

Adicionalmente existe cierta contaminación fecal por el aislamiento de *Enterobacter cloacae* (5%) perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que es parte de la flora gastrointestinal humana <sup>(25,26)</sup>. Se ha reportado que esta enterobacteria puede producir infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados o inmunosuprimidos <sup>(25,26)</sup>. Este género bacteriano posee una resistencia intrínseca a la ampicilina y a las Cefalosporinas de espectro reducido <sup>(25)</sup>. En el caso de este estudio la falta de resistencia a la Ampicilina se debe a la combinación con Sulbactam, que como se conoce incrementa su actividad al unirse irreversiblemente a betalactamasas mediadas por plásmidos, neutralizando así este mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos <sup>(33)</sup>. En este estudio no se aisló *Escherichia coli* a diferencia de lo reportando en el estudio previo de Infección de sitio operatorio realizado en hospital Nacional San Rafael, que fue la enterobacteria mas frecuentemente aislada, siendo la mayoría de las cepas resistentes a Trimetroprim Sulfametoxazol y Amoxicilina <sup>(4)</sup>.

El porcentaje de resistencia a Meticilina encontrado para el género *Staphylococcus* fue del 37 % para *S. aureus* y del 9 % para *S. coagulasa negativo* (Ver cuadro 2). Esta diferencia es comparable con las tasas de resistencia descritas en pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) encontradas en el estudio de Fridkin y col. <sup>(31)</sup>.

Esperábamos un porcentaje mayor de cepas multiresistentes porque en el ambiente hospitalario ya que las bacterias son sometidas a una alta presión de selección, ocasionado por el amplio uso de antibióticos, que trae como consecuencia que persistan las bacterias multiresistentes <sup>(33)</sup>. Las tasas de resistencia encontradas para los antibióticos Amikacina y Ampicilina-sulbactam son bajas y nulas para Imipenem y Ciprofloxacina (ver cuadros 2,3), lo cual se podría relacionar con el uso restringido de estos antibióticos en el hospital. La resistencia a Cefotaxima fue encontrada en 5 (54%) de las bacterias y siendo una Cefalosporina de tercera generación, se podría relacionar

con el uso frecuente de Ceftriaxona dentro del hospital <sup>(37)</sup>. En un estudio previo realizado en el Hospital Nacional San Rafael, en pacientes con infección de sitio operatorio las tasas de resistencias descritas para cinco antibióticos del cuadro básico de medicamentos fueron altas, llegando a ser de hasta el 42% para Ciprofloxacina y 3% para Imipenem <sup>(4)</sup>. En nuestro estudio no se reporta ninguna cepa resistente para dichos antibióticos; estas diferencias en el patrón de resistencia sugiere orígenes diferentes.

Se encontró una cepa del complejo *A. baumannii/calcoaceticus* multiresistente, la cual provenía de la lámpara quirúrgica. Factores que ejercen una influencia para la presencia de este tipo de cepas pueden ser: la exposición al aire, la emisión de calor, además de ser un objeto difícil de manipular y desinfectar. En el estudio previo realizado para los pacientes con ISO en dicho hospital, del total de complejo *A. baumannii/calcoaceticus* (n=2) el 100% resulto ser multiresistentes y con sensibilidad únicamente al Imipenem, comportamiento similar al de la cepa multiresistente del presente estudio <sup>(38)</sup>.

El complejo *A. baumannii/calcoaceticus* resulto resistente a todos los antisépticos y desinfectantes utilizados, exceptuando el sin diluir Ceticuat® el cual fue efectivo, por lo que se puede concluir que esta sustancia es mas eficiente en su actividad bactericida que el fenol aunque no es efectiva en la dilución de 1:100 utilizada en el HNSR (ver cuadro 4). Este hallazgo obliga a usar antisépticos y desinfectantes diferentes a los que se usan actualmente en las salas de operaciones del hospital San Rafael, ya que estos no erradican a la cepa multiresistente utilizando las concentraciones recomendadas por los fabricantes y evidencian la necesidad de establecer un programa de rotación de los antisépticos y desinfectantes utilizados para la limpieza, implementar un control de calidad de antisépticos, continuar los controles microbiológicos que se realizan<sup>(40)</sup>; ya que, estas son medidas básicas para todas las salas de operaciones incluyendo las del hospital San Rafael<sup>(23)</sup>.

A pesar de que el coeficiente de fenol es la prueba clásica utilizada, al momento existen otras pruebas que incluyen un método de transporte del inóculo para medir la actividad bactericida, que implica el ensayo de cultivos puros que están desecados sobre hilos quirúrgico o dentro de pequeños cilindros de acero inoxidable, frente a un germicida químico específico a un tiempo y temperatura de contacto controlado <sup>(35)</sup>. Además

existen otros estudios como el llevado a cabo en el Departamento de Microbiología de Young University Utah, en donde se comprueba la existencia de métodos con igual eficacia para la evaluación de desinfectantes, más sencillos y que requieren menos tiempo para realizarlos y que también permite evaluar la actividad de antisépticos/desinfectantes que han estado en uso, dándoles una mayor importancia para su aplicación clínica <sup>(34)</sup>.

## 11) Conclusiones.

- El ambiente de sala de operaciones se encuentra contaminado no solo por bacterias, si no también por hongos miceliales y levaduras; Aunque la mayoría de ellos son bacterias ambientales sin potencial patógeno, el 37% de las aisladas son potencialmente patógenas.
- Las bacterias aeróbicas potencialmente patógenas aisladas fueron: del genero *Staphylococcus* (*aureus* y *coagulasa negativo*), complejo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* y *Enterobacter cloacae*.
- La presencia de las bacterias potencialmente patógenas antes mencionadas son de suma importancia, debido al papel que ejercen en el desarrollo de enfermedades en pacientes inmunosuprimidos e infecciones nosocomiales (bacteremia transitoria, neumonía e ISO).
- El origen de las bacterias potencialmente patógenas fue diverso, siendo más frecuente la mesa quirúrgica, el segundo sitio en frecuencia fue el aire, seguido de la mesa anestésica, lámpara y cauterio.
- Siendo el género *Staphylococcus* el aislado con mayor frecuencia, se puede sospechar que existe contaminación por la flora normal del personal de sala de operaciones.
- Se puede concluir que existe cierta contaminación fecal por la presencia de el *Enterobacter cloacae* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, habiéndose aislado de lámpara quirúrgica y cauterio.
- Existe una diferencia en el porcentaje de resistencia a Meticilina encontrado entre *S. aureus* y *S. coagulasa negativo*. Siendo mas frecuente para el *S. aureus* (37%).
- Las tasas de resistencia encontradas para los antibióticos utilizados son bajas y nulas para Imipenem y Ciprofloxacina.
- Las bacterias aeróbicas nosocomiales aisladas no son similares en cuanto a frecuencia o patrón de resistencia a las descritas en estudios anteriormente realizados en el Hospital San Rafael, lo que sugiere diferentes orígenes.
- La cepa del complejo *A. baumannii/calcoaceticus* resulto resistente a todos los antisépticos y desinfectantes utilizados, exceptuando al Ceticuat® sin diluir, por lo que se puede concluir que esta sustancia es mas eficiente en su actividad

bactericida que el fenol, aunque hay que señalar que no es efectiva en las concentraciones sugeridas por el fabricante.

- El hallazgo de resistencia a todos los es de especial importancia, debido a que indica mutaciones bacterianas ante una presión selectiva y plantea la necesidad de mejorar las medidas de desinfección aplicadas en las salas de operaciones del Hospital Nacional San Rafael.

## **12) Recomendaciones.**

En base a los resultados del presente estudio, es necesario continuar realizando de forma periódica controles microbiológicos dentro de las salas del Hospital Nacional San Rafael, que comprenda además del aislamiento el análisis de multiresistencia para verificar la erradicación o la aparición de nuevas cepas resistentes, además se debe elaborar un protocolo para la utilización de antisépticos y desinfectantes el cual incluya una adecuada rotación, control de calidad en la preparación de las diluciones, frecuencia apropiada de uso y tiempo conveniente de exposición, el cual sea conocido por todo el personal de las salas de operaciones del Hospital Nacional San Rafael, con el objetivo de disminuir la incidencia de infecciones nosocomiales en dicho Hospital

Aunque los resultados sugieren fuentes diferentes de infección para las ISO en el HNSR, por el hallazgo de patrones diferentes de multiresistencia, es conveniente mantener la vigilancia epidemiológica y buscar otras fuentes de infección.

### 13) Anexo 1

#### Técnicas.

- **Tinción Gram:** Basándose en su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Esta tinción tiene gran importancia en taxonomía bacteriana y depende esencialmente de la naturaleza química de las paredes celulares de los microorganismos indicando diferencias fundamentales en ellas. Mientras que las bacterias Gram negativas son constantes en su reacción, los microorganismos Gram positivos pueden presentar respuestas variables en ciertas condiciones (son Gram lábiles). Por ejemplo, los cultivos viejos de algunas bacterias Gram positivas pierden la propiedad de retener el cristal violeta, y en consecuencia, se tiñen por la safranina apareciendo como Gram negativas <sup>(11)</sup>.

Método Frotis: En un portaobjetos bien limpio se coloca una gota de solución salina normal con el asa bacteriológica, previamente esterilizada a la llama, se lleva una pequeña cantidad de una colonia. Con el asa se extiende la gota y las bacterias sobre el portaobjetos, se espera que se seque el aire y se fija la extensión por el calor, calentando suavemente a la llama del mechero.

Coloración:

- a) Se cubre el frotis 1 minuto con cristal violeta (colorante inicial)
- b) se lava con agua de chorro
- c) 1 minuto en lugol (mordiente), se lava con agua de chorro
- d) se decolora con alcohol acetona (decolorante) por 15 seg.
- e) se lava con agua de chorro
- f) 1 minuto con safranina (colorante de contraste)
- g) se lava con agua de chorro.
- h) se seca al ambiente <sup>(10)</sup>

## **Identificación Gram positivo**

- **Producción de Hemólisis:** Fundamento: Algunos microorganismos, cuando se cultivan "in vitro" sobre medios que contienen sangre, pueden producir alrededor de las colonias unas zonas de hemólisis variables, según se origine una destrucción parcial o total de los eritrocitos. Las sustancias responsables de estos fenómenos son exotoxinas, liberadas por las bacterias al medio, llamadas hemolisinas.

Se visualiza en el Medio de cultivo: Agar-sangre, constituido por un medio básico (Ej.: agar nutritivo o Tripticasa soya agar (TSA) adicionado de un 5% de sangre desfibrinada de carnero.

Procedimiento: inocular siguiendo el método de estrías. Incubar durante 18- 24 horas a 35°C.

Lectura e interpretación de resultados: podemos encontrar  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  hemólisis.

La  $\alpha$ -hemólisis es una hemólisis parcial, en la que los hematíes son parcialmente dañados. Se observa por una estrecha zona verde alrededor de la colonia.

La  $\beta$ -hemólisis se caracteriza por una zona clara e incolora que rodea a la colonia, debido a la destrucción total de los glóbulos rojos. Es una hemólisis total.

En la  $\gamma$ -hemólisis no se observa ninguna variación alrededor de las colonias ni actuación sobre los glóbulos rojos.

*Interés:* esta característica es importante para determinar las diferentes especies de *Streptococcus*: por ej. *S. pyogenes* es  $\beta$  -hemolítico; *S. pneumoniae* es  $\alpha$  -hemolítico <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Catalasa:** investiga la presencia en el microorganismo de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, que se desprende en forma de burbujas en el medio. El

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares; si se acumulara sería tóxica para la bacteria.

Reactivo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3%.

Procedimiento: Con un aplicador de madera, recoger el centro de una colonia pura de 18-24 h. y colocarla sobre un portaobjetos limpio. A continuación agregar una gota de peróxido de hidrogeno de 10 volúmenes sobre el microorganismo del portaobjetos. No invertir el orden del método pues pueden registrarse falsos positivos especialmente si se utilizan hilos o asas que contengan hierro. Si se utilizan asas de platino también se puede caer en este error ya que el platino puede producir un resultado falsamente positivo, por lo que se utilizara un palillo de madera. El nicrom no ocasiona estos problemas. No es necesaria la mezcla del cultivo y el agua oxigenada con la aguja o el asa de inoculación. Si el microorganismo es catalasa [+] se observará de inmediato la aparición de burbujas (liberación de gas).

Lectura: diferenciación de los géneros: - *Streptococcus* [-], *Micrococcus* [+] y *Staphylococcus* [+] - *Clostridium* [-] y *Bacillus* [+] <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Coagulasa:** investiga la presencia de la enzima coagulasa. La coagulasa se puede encontrar en dos formas: libre y fija o ligada (unida a la pared bacteriana). La coagulasa es una enzima con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible.

No se debe emplear sangre citratada pues los microorganismos que utilizan citrato, como por ej. *Streptococcus faecalis*, pueden dar una falsa reacción positiva.

Procedimiento:

Prueba en tubo: con 0.5 ml de plasma inocular dos o tres colonias aisladas, hasta formar una suspensión, la cual se coloca en la estufa bacteriológica para

incubarla a 35° C, observar a las 4 horas la formación de coagulo a mayor tiempo este se puede lisar <sup>(9)</sup>.

Lectura e interpretación de resultados La reacción se considera positiva ante cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. La reacción se observa mejor inclinando el tubo. Si es positiva, el coágulo permanece en el fondo del tubo. Reacción negativa: ausencia de coágulo tras 18-24 horas de incubación.

Interés: se utiliza de manera específica para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus* <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Manitol:** Sirve para detectar si los gérmenes son capaces de fermentar el manitol liberando productos ácidos que serán detectados gracias al indicador rojo de fenol que cambiará a color amarillo. Para esta prueba el medio manitol movilidad incluye 7,5 g/l de D-Manita. Bacterias manitol (-) son, dentro de las enterobacterias, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Shigella dysenteriae*. Entre las bacterias de importancia clínica, la prueba del manitol sirve para diferenciar *Staphylococcus aureus* (+) de *Staphylococcus epidermidis* (-) <sup>(9)</sup>.
- **Tolerancia al cloruro de sodio:** determina la facultad de un organismo de desarrollarse en presencia de una concentración de 6.5 % de cloruro de sodio.

Procedimiento: se Inocula en el caldo ICC con cloruro de sodio al 6.5% un cultivo previamente incubado por 18 - 24 horas, se incuba a 35° C por 24 horas. Se puede controlar periódicamente, y esperar hasta las 72 horas antes de informar como negativo. <sup>(9)</sup>

Lectura:

Positivo: Hay desarrollo bacteriano

Negativo: No se observa crecimiento en el caldo

Controles

Control negativo: *Escherichia coli*

Control positivo: *Staphylococcus aureus*

### **Identificación Gram negativo**

- **Prueba de Citrato:** mediante esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono. El medio incluye citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato como única fuente de carbono también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco, llevando a la alcalinización del medio. El medio lleva un indicador, el azul de bromotimol, que es amarillo a pH ácido, verde a pH neutro y azul a pH alcalino.

Medio de cultivo: Medio de citrato de Simmons en Bisel.

Procedimiento: sembrar en el bisel, el microorganismo obtenido en medio sólido. Incubar a 35° C de 18-24 horas <sup>(9)</sup>.

Lectura e interpretación de resultados: Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en bisel después de 18-24 horas de incubación.

Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (el medio permanece de color verde.) Si se observa crecimiento sin cambio de color, se confirmará la positividad de la prueba incubando el tubo 24 horas más, durante las que suele aparecer el color azul.

- **IMVIC** incluye las pruebas de citrato Indol, Rojo de Metilo y Voges Proskauer y movilidad, sirven, para la diferenciación de los géneros de las *Enterobacteriaceas* <sup>(9)</sup>.

- **MIO ( movilidad indol ornitina)**

**Prueba de Movilidad:**

Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente en algunos bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles.

En las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar los géneros *Klebsiella* (+) *Shigella* (-) y otros de las restantes que suelen ser movilidad (+) (*Salmonella*, *Proteus*, etc). Dentro del género *Bacillus*, nos permite diferenciar *B.anthraxis* (-) de otras especies generalmente (+) <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Indol:** investiga en el microorganismo la presencia de la enzima triptofanasa o triptofanodesaminasa, capaz de desdoblar el triptófano en indol más alanina. Se detecta la presencia de esta enzima mediante la reacción del indol producido con el reactivo p-dimetilaminobenzaldehído.

Medio de cultivo: caldo de peptona y se utiliza el reactivo de Kovacs para la lectura.

Procedimiento: sembrar con aguja bacteriológica el medio con el microorganismo objeto de estudio. Incubar a 35° C durante 18-24 horas.

Lectura e interpretación de resultados: se agregan unas gotas del reactivo de Kovacs directamente sobre el tubo incubado y se agita. En caso de que la prueba sea positiva, es decir, en caso de que se haya producido indol, éste reaccionará con el p-dimetilaminobenzaldehído, apareciendo un anillo de color rojo en la superficie del tubo. El HCl tiene como función bajar algo el pH, favoreciéndose así la reacción, y el alcohol amílico concentra el color en la superficie. Puede también utilizarse el reactivo de Erlich para realizar la lectura <sup>(9)</sup>.

- **Rojo de Metilo - Voges-Proskauer (RM VP):** Una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen dos

tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.<sup>(9)</sup>

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta..

El acetil-metil-carbinol (o acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia<sup>(9)</sup>

Técnica: Inocular el caldo RMVP con un cultivo puro de no más de 24 horas de la bacteria en estudio. Incubar a 35°C durante 48 horas. Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 mL del caldo a un tubo limpio para VP. En el caldo restante revelar RM agregando unas 4 - 8 gotas del indicador rojo de metilo. Para revelar VP agregar 0,6 ml (10 gotas) de alfa-naftol al 5% y 1 gota de KOH al 40%. Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos.

Interpretación: La prueba RM es positiva si se desarrolla un color rojo estable. Esto indica que la producción de ácido es suficiente para producir el viraje del indicador y la bacteria fermentó la glucosa por la vía de ácido mixta. Un color anaranjado, intermedio entre el rojo y el amarillo no es considerado como positivo<sup>(9)</sup>.

La prueba VP es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia luego de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetona<sup>(9)</sup>.

Controles

RM positivo, VP negativo: *Escherichia coli*

RM negativo, VP positivo: *Enterobacter aerogenes* <sup>(9)</sup>.

- **Descarboxilación de ornitina:** La descarboxilación de aminoácidos es llevada a cabo por descarboxilasas y se forman aminas y CO<sub>2</sub>. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente para la identificación son lisina, ornitina y arginina <sup>(9)</sup>.

El caldo descarboxilasa de Moeller es el medio base más comúnmente usado para la determinación de las descarboxilasas en enterobacterias. Se prepara un tubo con el medio conteniendo el aminoácido a ensayar y un tubo control con medio base sin aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral (vaselina líquida) para hacer el medio anaerobio de manera que ocurra la fermentación de la glucosa que contiene. Durante las primeras etapas de la incubación en ambos tubos se observará viraje del indicador de pH del medio al ácido, por la fermentación de la glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino <sup>(9)</sup>.

Caldo Ornitina de Moeller: Preparar igual al medio base y agregar 10 g del aminoácido (1% de concentración final de la forma levo, utilizar el doble si se usa la forma dl del aminoácido ya que solo la levo es activa). Agregar aceite mineral para formar una capa de 1 cm de espesor <sup>(9)</sup>.

Técnica: Inocular con un cultivo puro de 24 horas un tubo de base de Moeller con el aminoácido ornitina y un tubo de la base (control sin aminoácido). Incubar a 35°C durante 18 a 24 horas <sup>(9)</sup>.

Interpretación: El ensayo puede ser leído si en el tubo control se observa crecimiento y viraje del indicador al amarillo indicando que se dio la fermentación de la glucosa y un descenso de pH que permite la activación de las descarboxilasas. El retorno al color azul-violeta en el tubo que contiene el aminoácido indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Ureasa:** mediante esta prueba determinamos la capacidad del microorganismo de desdoblar la urea en CO<sub>2</sub> y amoníaco por acción de la enzima ureasa. Se visualiza el proceso debido a que la alcalinidad que se produce origina un cambio de color en el indicador que lleva incorporado el medio. Esta prueba se puede realizar en tubo con medio líquido o sobre discos de papel de filtro.

#### Prueba en tubo

Medio de cultivo: Medio de urea de Christensen: El medio se esteriliza en el autoclave. Se deja enfriar hasta 50-55°C y a esta temperatura se le añaden 100 ml de solución de urea al 20% en agua destilada, esterilizada por filtración. Se distribuye el medio asépticamente en tubos estériles y se deja enfriar en posición inclinada.

Técnica: sembrar el bisel con un inóculo denso e incubar a 35-37°C durante 1-6 días, observando las primeras 6 horas y luego cada 24 horas.

Lectura e interpretación de resultados: Se considera la prueba positiva [+], es decir, el microorganismo será ureasa [+] si debido a la alcalinización del medio, éste toma una coloración rosada maravilla. Interés: todas las especies del género *Proteus* dan positiva esta reacción dentro de las 6 primeras horas, virando la superficie del medio a color rojo-rosáceo. Se puede así diferenciar el género *Proteus* de otros microorganismos ureasa [+] retardados como especies de *Klebsiella* o *Enterobacter*, así como de microorganismos ureasa [-] como *E.coli*.<sup>(9)</sup>

- **Prueba de la Oxidasa:** investiga la presencia de la enzima citocromooxidasa en el microorganismo, la cual oxida al dimetil-parafenilen-diamina (reactivo incoloro) dando un producto de color. El sistema citocromooxidasa se encuentra, por lo general, en microorganismos aerobios.

Reactivos: Dimetil-p-fenilendiamina o tetrametil-p-fenilendiamina impregnado sobre tiras o discos de papel de filtro.

Procedimiento. Lectura e interpretación de resultados: Colocar una tira o disco impregnado de reactivo recién preparado en un porta objetos o caja de Petri. Luego tomar una colonia con el aplicador de madera y depositarla sobre la tira o disco. La aparición de un color azul oscuro indica la existencia del enzima citocromooxidasa (prueba positiva).

Interés: ayuda a la identificación de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Vibrio* *Enterobacterias* [-], entre otros <sup>(9)</sup>.

- **Prueba de Susceptibilidad (Antibiograma).**

Agar Muller Hinton.

Es el medio validado por el NCCLS para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos por difusión de disco.

De los medios disponibles se considera el agar Muller-Hinton el mejor de las pruebas de sensibilidad de rutina dado que; muestra buena reproducibilidad, contiene bajo nivel de inhibidores (sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclina) y es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias de crecimiento rápido.

Preparación:

Se prepara a partir de la base deshidratada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Inmediatamente después de esterilizar se enfría en baño de agua hasta 45-50 C. Se coloca el medio en placas de Petri hasta alcanzar un nivel de 4mm. Esto corresponde 25 a 30 ml para placas de 100 ml.

Las placas que no se usen en el día se pueden mantener en el refrigerador a 2-8 °C. Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para la prueba de sensibilidad salvo que sean guardadas en bolsas de plástico para evitar la desecación. Debe controlarse la esterilidad de cada lote incubando las placas 18-24 horas a 35 C. <sup>(20)</sup>

Almacenamiento de Discos.

Los discos de antibióticos deben de mantenerse refrigerados de 4 a 8 °C o en congelador a – 14 °C. o menos para mantener el fármaco en condiciones optimas. Los discos con antibióticos de la familia betalactamicos deben mantenerse en

congelador para mantener su potencia. Los discos deben de ser sacados del refrigerador 1 o 2 horas antes de su uso, a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abierto los frascos. Cuando el indicador del desecador usado cambia de color debe interpretarse como un exceso de humedad y debe remplazarse. <sup>(20)</sup>

Turbidez estándar para la preparación del inóculo.

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de McFarland).

Se prepara dicho estándar agregando 0.5 cc de  $\text{BaCl}_2$  0.048M a 99.5 cc de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,18M (0,36N)(1% V/V). Se verifica la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm debería de ser 0,08-0,10 para el estándar 0.5 McFarland. Se distribuye 4-6 ml dentro de los tubos similares a los que va a usar para preparar inóculos, se mantienen los estándares guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Se agita vigorosamente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea. Se puede remplazar la confiabilidad de los estándares mensuales. <sup>(20)</sup>

Preparación del inóculo.

Método de desarrollo previo.

Se selecciona de 4 o 5 colonias aisladas de igual morfología en la placa de cultivo no selectivo. Se prepara una suspensión en 4 o 5 ml de un caldo TSB tocando la parte superior de cada colonia. Posteriormente se incuba a 35 °C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar (2-6 hrs.).

Se ajusta la turbidez del inóculo con solución salina fisiológica estéril o caldo hasta el tubo de 0,5 de la escala de McFarland, por comparación visual con el estándar. Para ello, observe los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Esta suspensión contendrá aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/ml para la bacteria estudiada. <sup>(20)</sup>

Inoculación de placas.

Dentro de los 15 min después de ajustado el inóculo se siembran las placas de Muller Hinton con un hisopo estéril. Inocule la superficie por hisopado en 3 direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Las zonas de

inhibición serán uniformemente circulares y el desarrollo confluyente o casi confluyente. Si crecen solo colonias aisladas el antibiograma debe repetirse. Espere de 3 a 5 min., pero no más de 15 min. antes de aplicar los discos, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido. <sup>(20)</sup>

Aplicación de los discos de Antibióticos en las placas inoculadas.

Se colocan los discos sobre la superficie del agar inoculado con una pinza estéril aplicando una ligera presión, colocar el siguiente disco a una distancia no menor de 24 mm desde un centro al otro. Debido a que algunos antibióticos difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 5 discos por placa de 100 mm.

Las placas se incuban invertidas a 35°C. <sup>(20)</sup>

Lectura de las placas e interpretación de resultados

Después de 16 a 18 horas de incubación se examina cada placa y se mide los diámetros de las zonas de inhibición con una regla graduada. Si las placas fueron satisfactoriamente hisopadas y el inoculo fue el correcto, Las zonas de inhibición serán uniformemente circulares y habrá desarrollo confluyente. Si el microorganismo estudiado es *Staphylococcus spp* o *Enterococcus spp*. Incube 24 horas para vancomicina y oxacilina, pero los antimicrobianos pueden leerse entre las 16 a 18 horas. Se utiliza luz transmitida para examinar un ligero crecimiento de cepas meticilino o vancomicino resistente dentro de las zonas de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de meticilino o vancomicino resistente. <sup>(20)</sup>

El punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a simple vista, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que pueden ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp* podrian presentar “Swarming” dentro de las zonas de inhibición con algunos antimicrobianos, en estos caso el velo del “Swarming” deberá ser ignorado. En medios suplementados con sangre, se debe de medir la zona de inhibición del crecimiento, no la zona de inhibición de la hemólisis. Cuando se prueban discos de Trimetoprin/Sulfametoxazol pueden

arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto a niebla dentro de la zona de halo de inhibición, en estos casos no se considera la lectura un crecimiento del 20 % o menos del desarrollo total. <sup>(20)</sup>

De acuerdo a las tablas de interpretación establecidas por la NCCLS, los organismos se informaran sensibles, intermedios o resistentes frente al antibiótico ensayado. <sup>(20)</sup>

- **Coefficiente de Fenol:**

La prueba del coeficiente de fenol, nos permite determinar la efectividad antimicrobiana de sustancias antisépticas o desinfectantes frente al fenol. Se calcula dividiendo la dilución mayor del desinfectante o antiséptico que destruye las bacterias en un tiempo de 10 minutos de incubación pero no después de 5 minutos entre la dilución mayor del fenol que tenga las mismas características. Si el desinfectante o antiséptico en prueba tiene un coeficiente mayor de 1 es más efectivo que el fenol.

Previo a iniciar la prueba, se necesita un cultivo bacteriano caldo de tripticasa Soya en fase exponencial (20 horas).

Para realizar el coeficiente de fenol se diluye fenol en solución salina normal hasta obtener soluciones de 1/80, 1/90, y 1 /100. Se diluye el antiséptico seleccionado a la concentración establecida por el fabricante, además de una concentración menor y una mayor. Para que el volumen final sea de 5 cc. por tubo. Se identifican 18 tubos con caldo de tripticasa soya con el nombre y dilución de desinfectante, el intervalo de tiempo del subcultivo (ejemplo: 5 min. Fenol 1/80). Se ubicaran en orden y se coloca un tubo para cada diferente dilución, tanto de antiséptico como fenol, para cada intervalo de tiempo. Se agregara 0.5 cc. del caldo de tripticasa soya con bacteria cultivadas hasta la fase exponencial (20 horas) a cada tubo, se mezcla para obtener suspensiones homogéneas y luego utilizando una técnica aséptica a un intervalo de 5,10 y 15 minutos se transfiere el contenido de una asa estandarizada (10 $\mu$ ) de cada uno de los tubos con desinfectantes/ antisépticos a los tubos que contienen TSB, previamente identificados. Se incuban por 18-24 horas a 35°C.

Posteriormente se observa la presencia o ausencia turbidez. Se procede a calcular el coeficiente de fenol, dividiendo las concentraciones inhibitorias encontradas.<sup>(12)</sup>

## 14) Anexo 2

### Glosario.

#### ---A---

- **Antisépticos:** son biocidas o sustancias que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos y que son seguros para su aplicación en tejido vivo <sup>(1)</sup>.

#### ---B---

- **Biocida:** es un término general para describir una sustancia química, usualmente de amplio espectro, que inactiva los microorganismos <sup>(1)</sup>.

Otros vocablos pueden ser más específicos, por ejemplo «-estático», que se refiere a agentes que inhiben el crecimiento (e.g., bacteriostático, fungiestático y esporostático) y «-cida», que hace referencia a agentes que matan al organismo blanco (e.g., esporicida, virucida y bactericida) <sup>(1)</sup>. Antibiótico: se define como una sustancia orgánica, natural o sintética, que inhibe o destruye en forma selectiva bacterias y otros organismos, generalmente a bajas concentraciones <sup>(1)</sup>.

#### ---D---

- **Descontaminación:** Es el proceso que remueve microorganismo patogénico de objetos para poder utilizarlos con seguridad <sup>(7)</sup>.
- **Desinfectantes:** son similares, pero por lo general son sustancias o biocidas que se usan sobre objetos inanimados o en superficies <sup>(1)</sup>.
- **Desinfección:** El proceso que elimina muchos o la mayoría de microorganismo o patógenos que se encuentran en objetos inanimados, exceptuando las esporas bacterianas. Usualmente la desinfección es lograda mediante el uso de sustancias químicas o pasteurización húmeda en objetos utilizados de importancia con respecto a la salud. La eficacia de este proceso es afectada por distintos factores los cuales cada uno puede anular o limitar la eficacia del proceso. Algunos de estos factores que afectan tanto a la desinfección como a otros procesos es la limpieza previa del objeto la carga orgánica e inorgánica presente; el tipo y nivel de contaminación microbiana; la concentración o el tiempo de exposición al

germicida, la naturaleza del objeto y en algunas ocasiones las características intrínsecas de las sustancias químicas utilizadas, como su humedad, su pH, etc. Al hablar de desinfección es necesario mencionar la clasificación de Earl Spaulding: desarrolló un sistema de clasificación para la instrumentación a finales de los años 60. El sistema de Spaulding es usado para determinar los métodos apropiados para la preparación de los instrumentos médicos antes de su uso. La utilización del instrumento determina el nivel de desinfección que se requiere <sup>(7)</sup>.

Hay tres niveles de desinfección:

- Baja: elimina la mayoría de las bacterias y algunos virus y hongos pero no la *Mycobacterias* o las esporas bacterianas.
- Intermedia: elimina la mayoría de las bacterias, virus y algunos hongos pero no mata esporas <sup>(7)</sup>.
- Alta: elimina todos los microorganismos, excepto alto número de esporas <sup>(7)</sup>.

#### ---E---

- **Esterilización:** Es el proceso de completa eliminación o destrucción de todas las formas de vida microbianas, llevado a cabo en instalaciones de salud por medio de procesos físicos y/o químicos. Los principales agentes usados en instalaciones de salud son el calor húmedo a presión, calor seco, gas ETO, gas plasma de peróxido de hidrógeno, y agentes químicos líquidos. Un error muy común, incluso cometido por personas involucradas en el ámbito de salud, es confundir los términos, desinfección con esterilización o utilizar el término parcialmente estéril, el cual es incorrecto, ya que como se menciona anteriormente este último término es absoluto <sup>(7)</sup>.

#### ---L---

- **Limpieza:** Simplemente es remover materia orgánica como inorgánica de objetos y superficies, normalmente se lleva a cabo frotando y/o utilizando agua con detergentes o productos enzimáticos. Este proceso es esencial, antes de realizar tanto la desinfección o esterilización de objetos ya que el remanente de materia orgánica como inorgánica en estos objetos afecta enormemente la efectividad de estos procesos <sup>(7)</sup>.

--M--

- **Multiresistencia:** Aunque no hay una definición precisa de bacteria multirresistente, se ha sugerido que el término debiera aplicarse a aquellos microorganismos que son resistentes a dos o más grupos de antimicrobianos habitualmente empleados en el tratamiento de las infecciones por el microorganismo considerado y que esta resistencia tenga relevancia clínica <sup>(15)</sup>.

--R--

- **Resistencia a antimicrobianos:** Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos <sup>(6)</sup>.

Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico <sup>(4)</sup>.

--S--

- **Sedimentación pasiva:** Consiste en dejar cajas de Petri con medio de cultivo agar sangre de carnero, expuestas durante 20 minutos, y esperar la sedimentación de microorganismos ambientales.

**Anexo 3**

**Servicio de Sala de operaciones Hospital Nacional San Rafael.**

El servicio de sala de operaciones del hospital nacional san Rafael, cuenta con 5 salas de operaciones, 3 utilizadas de planta y 2 de turno, así como también, cuenta con estación de enfermería, sala de recuperación y 2 bodegas. Todas con daños infraestructurales causadas por los sismos sufridos en el país. Cada una con una puerta de ingreso comunicando al pasillo central, las cuales se encontraban situadas de una forma inadecuada, ya que se encontraban frente a frente, promoviendo así el flujo de contaminantes de una sala a otra (Ver Esquema1).

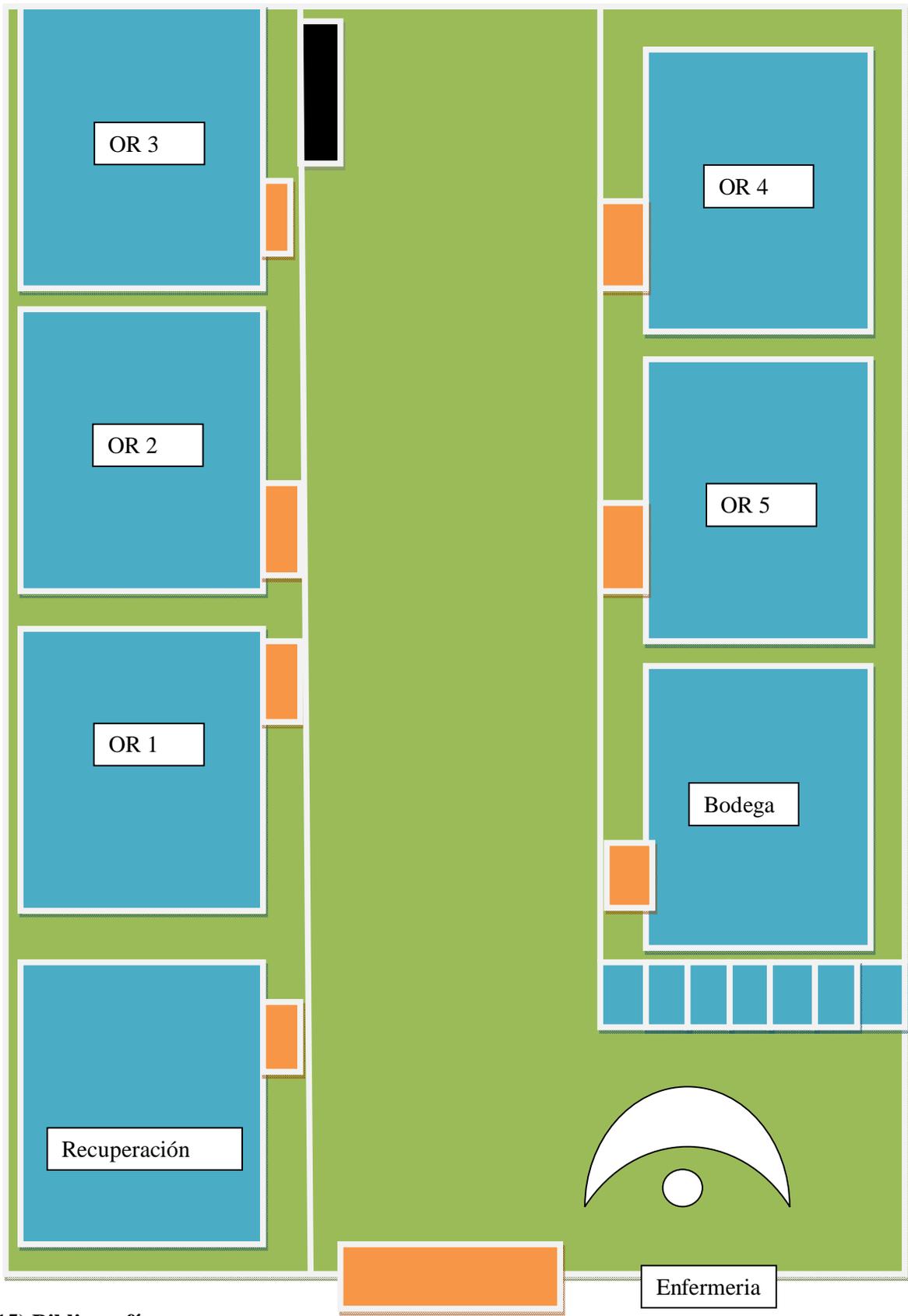
### **Método de limpieza y desinfección del Hospital Nacional San Rafael.**

Las salas de operaciones del HNSR se limpian y desinfectan habitualmente, de acuerdo a: semanalmente, a el tipo de cirugía que se ha realizado y a el control microbiológico quincenal. Generalmente la limpieza y desinfección se realiza periódicamente cada sábado, o posteriormente a que se realice un procedimiento quirúrgico con un alto nivel de contaminación. Otra ocasión en donde se realiza una exhaustiva limpieza y desinfección, es en el caso que resulte positivo un control microbiológico a una bacteria patógena <sup>(40)</sup>. Habitualmente el desinfectante utilizado es la solución de Ceticuat<sup>R</sup>. Debido a carencias económicas en ciertas ocasiones, es necesario sustituir el Ceticuat<sup>R</sup> por lejía (hipoclorito de sodio). El antiséptico de elección utilizado en sala de operaciones, es solución yodada, que en ciertas ocasiones, es sustituido por jabón yodado, acorde a los recursos presentes en esos momentos <sup>(40)</sup>.

Con respecto al control microbiológico, este se realiza por el método de fricción de superficie, por el personal de enfermería, y posteriormente es llevado al laboratorio del hospital, para su procesamiento y análisis. Se realizan pruebas de sensibilidad a antibióticos de acuerdo a la técnica de kirby-bauer levemente modificada, debido a que los antibióticos utilizados son los que en ese momento se encuentran disponibles para la prueba. Los resultados son reportados a la jefa de enfermería del servicio de sala de operación, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se decide realizar una limpieza y desinfección con mayor ímpetu. Revisando los resultados del periodo de investigación, se podría decir que la bacteria mas común, es el *Staphylococcus aureus* <sup>(40)</sup>.



### **Esquema 1: servicio de sala de operaciones HNSR**



**15) Bibliografía**

OR: sala de operaciones

1. CABRERA, E; GÓMEZ, R. F; ZÚÑIGA, A. E; “*La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación*” *Colomb Med* 2007; 38: 149-158. Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol38No2/html/v38n2a7.html> accesado 16/02/08
2. Gajadhar, T; Lara, A; Sealy, P; & Adesiyun, A. “*Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad*” *Rev Panama* 2003, *Salud Publica/Pan Am J Public Health*, disponible en <http://www.ingentaconnect.com/content/paho/pajph/2003/00000014/00000003/art00006;jsessionid=1vvdq9wrubves.alice?format=print>. accesado 15/02/08
3. Rodríguez Pérez, A; Martínez Portilla, D; Páez Cuesta, N; Rodríguez Pérez, C. “*Estudio de la resistencia de microorganismos aislados de infecciones nosocomiales*”. *Rev. Méx. Patol Clin* 2006 vol. 53 # 2 pp 119-122. Disponible en [www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2006/pt062h.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2006/pt062h.pdf) - accesado en 14/02/08
4. Menjivar, A T; Murillo de Linares, L; González, E, Y; Menjivar Tobar, A. “*Bacterias aeróbicas responsables de infecciones de sitio operatorio y su sensibilidad a los antibióticos*”. *Rev. AKADEMOS* 2007 Vol. 2 # 2 pp. 8 - 18
5. Rutala W, Ph.D., M.P.H., Weber D.J. “*The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Draft Guideline for Disinfection and sterilization in Healthcare Facilities Innate Resistance of Microorganisms*” page 31 CDC 2/20/2002.
6. Fernández Riverón, F, López Hernández, J; Ponce Martínez, L M; Machado Betarte, C. “*Resistencia Bacteriana*”, disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v32n1/mil07103.pdf> accesado en 21\02\08
7. Ministerio de salud pública y asistencia social, dirección de regulación. “*Manual organizativo de funcionamiento de la central de la esterilización hospitalaria.*” San Salvador, El salvador. Junio 2006.

8. Rutala, W. Weber, D & Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. “*Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*” CDC 02/20/02.
9. iespaña “*métodos de identificación bacteriana*” disponible en <http://inspeccion-uvmi3.iespana.es/inde6985.htm> accesado 03/04/08
10. University of Texas - Houston Medical School “*Introduction To Clinical Microbiology*” DPALM MEDIC 1995. disponible en <http://medic.med.uth.tmc.edu/path/grampro.htm> accesado 03/04/08
11. Torres, M. “*Manual Práctico de Bacteriología Médica*” editorial Serviprensa C.A. Guatemala, 1996. primera edición. pp 177-189.
12. Prescott, H. “*Laboratory exercises in microbiology*” McGraw-hill. USA, 1996 Tercera edición. pp 149-152.
13. Solera, J. “*Los nueve parámetros mas críticos para el muestreo del aire*” técnicas de LABORATORIO N° 276 NOVIEMBRE 2002 pp 858 - 862
14. Ministerio de salud publica, dirección general de salud. “*Recomendaciones para limpieza ambiental en áreas quirúrgicas*” Colombia 28: pp 130-144.
15. Rodríguez-Baño J, Pascual A. “*Microorganismos multirresistentes, ¿adquisición nosocomial o comunitaria?*” *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:505-6.
16. Figueroa. R, Regalado F, “*Infeción del sitio operatorio 1 y 2 por bacterias aeróbicas en el hospital nacional san Rafael*”. revista AKDAEMOS, año 2007 Pág. 57.
17. Anaya DA, Quintero GA. “*Infeción de sitio operatorio. En: Infeción en Cirugía*”. Editado por GA Quintero, JA Nieto, C Lerma. Editorial Panamericana. Bogota, 2001.

18. Revert Giron, C. “*Estudio epidemiológico de la infección nosocomial en el servicio UCI del hospital universitario de Canarias*” servicio de publicaciones universidad de la laguna, España, 2004.
19. Hoikyung, K; Jee-Hoon, R & Beuchat, L; “Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel, and in a Biofilm” Center for Food Safety and Department of Food Science and Technology, University of Georgia, 1109 Experiment Street, Griffin, Georgia, and Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-79.
20. Galas M; Corzo A; “*Quinto curso Latinoamericano de actualización en Antimicrobianos*” ministerio de Salud publica y Asistencia social, Laboratorio central Dr. Max Block. San Salvador, EL Salvador. Agosto 2000.
21. James L. Howard, MD, Hanssen, MD. “*Principles of a clean Operating Room Environment*” Departamento de cirugía ortopédica, Mayo Clinic, Rochester Minnesota. Estados Unidos Mayo 2007.
22. Borraz Ordás, María Carmen “*Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en hospitales españoles*” UB, departamento experimental de patología terapeutica, disponible en <http://www.tdx.cat/TDX-1027106-105221> España 2006.
23. Charles E. Edmiston, Jr. PhD et al, “Molecular epidemiology of microbial contamination in the operating room environment” Department of Surgery, Medical College of Wisconsin, Estados Unidos 2005 disponible en <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606005004216>
24. Baker, Z “Inhibition by Phospholipids In The Action Of Detergents on Bacteria” J. Expermed 74, 6:621-637 (Dec) 1941.
25. Keller, R; Pedroso, M; Ritchmann, R & Silva, R. “Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*” Sociedad Americana de

- microbiologia, E.E.U.U. 1998. Disponible en línea:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=9453621>
26. Okhravi, N; Ficker, L; Matheson, M; & Lightman, S “*Enterobacter cloacae* Endophthalmitis” Moorfields Eye Hospital, London United Kingdom 1997. Disponible en:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=124805>
27. Mamani, E; Luján, D; Pajuelo, G “Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*”. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima, Peru 2003. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/3100379/Perfil-de-sensibilidad-y-resistencia-de-staphylococcus-aureus-Experiencia-en-el-Hospital-Nacional-Hipolito-Unanue-An-Fac-Med>
- 29) Prakash, M; Rajasekar, K & Karmegam, N. “Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Samples Collected from Kanchipuram Town, Tamil Nadu, South India” Departamento de Microbiología, Escuela de artes y Ciencia Kanchi Shri Krishna Kilambi, Kanchipuram, India, 2007. Disponible en: <http://www.insinet.net/jasr/2007/1705-1709.pdf>
- 30) Van Griethuysen, A; Van 't Veen, A; Buiting, A; Walsh, T & Kluytmans, J. “High Percentage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Glycopeptides in The Netherlands” Instituto Nacional de Salud Pública y medioambiente, Bilthoven, Holanda 1998. Disponible en <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=12791870>
- 31) Peleg Anton, Seifert Harald, Paterson David, “*Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen” July. 2008 vol 21 2003. Clinical microbiology review American society of microbiology.
- 32) Fridkin Scott K, Md Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. Critic care med 2001 vol. 29 No 4 pag. 64.

- 33) M. Richards, J. Edwards, P. Gaynes Nosocomial Infections in combined medical –surgical intensive care units in the United States. August 2000 infection control and hospital epidemiology.
- 34) Wickens, H; Wade, P, Understanding antibiotic resistance. The Pharmaceutical Journal Vol 274, April 2005 Pag 501-504
- 35) Richard A. et all “*A Suspension Method To Determine Reuse Life of Chemical Disinfectants during Clinical Use*” Departamento de Microbiología, Proovo, Utah and Brigham Young University vol. 54 No 1, 28 September 1997.
- 36) Joklik P. *et al* Microbiología Zinsser, 20° Edición, Editorial Panamericana 1998.
- 37) Comunicación verbal Dr. Posada Residente de tercer año de cirugía general, Hospital nacional San Rafael, año 2008.
- 38) Menjivar, AT; Murillo L; González, EY; Menjivar, A. “*Bacterias aeróbicas responsables de infecciones de sitio operatorio y su sensibilidad a los antibióticos*”. Datos no publicados. Año 2008.
- 39) Baker, R. Quiet Killers: The fall and rise of deadly diseases. N Engl J Med 357; 17. Año 2007.
- 40) Comunicación verbal Lic. Aparicio M. Jefa de enfermeras del servicio de sala de operaciones, Hospital Nacional San Rafael, año 2008.

