



34
21

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

“DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN MANOS DE ESTUDIANTES DE UNA CLINICA DE PROSTODONCIA TOTAL”.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTAN :

MA. ELENA BRAVO BRAVO
MA. DEL ROSARIO ENRIQUEZ CABRERA

Tutor:

C.D. Sergio Sánchez García

Asesor:

Dr. Enrique Acosta Gio.

México, D.F.

Noviembre 1997.



FACULTAD DE
ODONTOLOGIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesina se realizó como parte del Programa de Seminario de Titulación en el Area de Bioquímica, cuya coordinadora es la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas.

JURADO:

Presidente:

Dr. Adelfo Enrique Acosta Gio

Vocal:

C.D. Sergio Sánchez García

Secretario:

Dr. Constantino Ledesma Montes

Suplente:

C .D. Marisela García Martínez

Suplente:

C.D. Gabriela Gutiérrez Venegas

Fecha de Exámen:

13 de Enero de 1998

Hora:

9: 00: A.M.

Este estudio fué realizado en el Laboratorio de Microbiología a cargo del Doctor Enrique Acosta Gio, en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS:

Al C. D. Sergio Sánchez García por el apoyo y dirección de este trabajo, involucrándose con nosotras compartiendo generosamente sus conocimientos.

Al Dr. Enrique Acosta Gio por el interés que creó en nosotras acerca de el Control de Infecciones y por permitir desarrollar nuestro trabajo en el Laboratorio de Microbiología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación.

A la C.D. Erika Heredia Ponce, por orientarnos y alentarnos a seguir adelante, discipando muchas de nuestras dudas.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venégas por su empeño y dedicación para la creación de este primer Seminario de Titulación de Bioquímica.

**“ DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN LAS MANOS DE
LOS ALUMNOS DE UNA CLÍNICA DE PROSTODONCIA TOTAL”**

BRAVO BRAVO MA. ELENA

ENRIQUEZ CABRERA MA. DEL ROSARIO

Tutor: C.D. Sergio Sánchez García

INDICE:

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Lavado de manos	2
1.2 Piel de las manos	2
1.3 Floras Microbianas	2
1.4. Staphylococcus	3
1.4.1. Clasificación	3
1.4.2. Características microscópicas	4
1.4.3. Resistencia a agentes físicos, químicos y biológicos	4
1.4.4. Características de aislamiento	4
a)medios de cultivo	4
b)condiciones de incubación	4
c)morfología microscópica	5
1.4.5. Patogenicidad	5
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3.JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	8
4.OBJETIVO GENERAL	9
4.1.Objetivo Especifico	9
5.HIPÓTESIS	10
6.DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA	11
6.1 Tipo de estudio	11
a)selección de sujetos de estudio	11

b)tipo y tamaño de la muestra	11
c)selección de variables	11
d)critérios de inclusión	11
e)critérios de exclusión	11
f)método de recolección de datos	12
g)procesamiento de datos	12
h)análisis estadístico	12
i)recolección de muestras	12
-Técnica de lavado	13
j)técnica de cultivo	13
-Siembra en placa	13
k)pruebas de identificación	13
-Detección de género	13
-Tinción de Gram	13
-Prueba de la catalasa	13
-Diferenciación de la especie	13
-prueba de la coagulasa	14
7.RECURSOS	15
7.1Financieros	15
7.2Humanos	15
7.3Materiales	15
7.3.1.Medios de Cultivo	15
7.3.2.Pruebas de identificación	16
7.3.3.Cristalería	16

8. RESULTADOS	17
8.1. Análisis de resultados	17
9. DISCUSIÓN	20
10. CONCLUSIONES	25
11. ANEXOS	26
1. Formato de aceptación	27
2. Jabón con Gluconato de Clorhexidina	28
3. Caldo Letheen Broth y Medio de Cultivo Mannitol Salt Agar	30
4. Esterilización con Rayos Gamma	32
5. Pruebas de Identificación	33
12. FIGURAS	37
13. GRÁFICAS	38
14. BIBLIOGRAFÍA	41

1.INTRODUCCIÓN:

1.1 Lavado de manos:

La práctica del lavado de manos puede jactarse de una larga contribución histórica. En 1199, Maimonides, un médico español en El Cairo, Egipto, reconoció la importancia de lavarse las manos después del contacto con personas enfermas. En los primeros años del Siglo XIX, Giannini de Italia, hizo énfasis en el lavado de manos después del contacto con cada paciente. En 1843, el médico americano Oliver Wendell Holmes proporcionó evidencia publicada convincente acerca del papel de las manos en la transmisión de infecciones entre paciente y paciente y el médico de la clínica obstétrica. Fue hasta 1847 que el médico vienés Semmelweis demostró la importancia del lavado de manos con antiséptico, en la reducción de infecciones en el ámbito del cuidado de la salud (1).

El lavado de manos es considerado como una de las medidas más importantes para prevenir infecciones nosocomiales. A pesar de esta importancia, existe evidencia de que el seguimiento de esta práctica se encuentra bajo, de los niveles recomendados (2). Durante los últimos años, el interés especial de las publicaciones acerca del control de infecciones, ha cambiado de la protección del paciente hacia la protección del trabajador de la salud (3).

La técnica de lavado de manos se entiende como un proceso para la remoción de suciedad y microorganismos transitorios de las manos; el método de asepsia manual es el proceso utilizado para la destrucción o remoción de microorganismos transitorios; en tanto que el cepillado manual para cirugía elimina o destruye flora residente. El jabón ordinario o no antimicrobiano, es un limpiador en cualquier presentación (barra, líquido, hojuelas o polvo) que se utiliza con el propósito primario de remoción física de suciedad y microorganismos contaminantes. Tales jabones trabajan principalmente por acción mecánica y no tienen actividad bactericida, aunque algunos de ellos contienen bajas concentraciones de

ingredientes antimicrobianos, estos se emplean como preservadores y tienen un efecto sobre la flora colonizante (4).

1.2. Piel de las manos (*fig 1-2 pag 37):

El estrato córneo, el cual representa la superficie de la piel de las manos, está formado por diminutas láminas. El estrato escamoso, está constituido por láminas planas de células epiteliales muertas (queratina). Estas células se desprenden continuamente y son reemplazadas por división celular proveniente de las capas más profundas de la piel.

El estrato córneo es la barrera principal de la piel, si está presenta algún daño, se convierte en un puerta de entrada para los microorganismos patógenos.

La superficie de la piel está cubierta por 2 fluidos acondicionadores:

-Transpiración (sudor):

Proviene de las Glándulas Sudoríparas, las cuales secretan agua principalmente.

-Secreción sebácea:

Es un fluido grasoso producido por las Glándulas Sebáceas.

La presencia de sudor y fluido grasoso conservan el estrato córneo en buenas condiciones. La combinación de ambos mantienen un nivel constante de acidez (pH 5.0-6.5) en la superficie de la piel y bajo estas condiciones la queratina se convierte en un material resistente, liso e impenetrable. A un pH más alto (8 o 9), la queratina se vuelve débil, y la superficie se vuelve áspera y relativamente porosa (5).

1.3. Floras microbianas

La frecuencia de lavado de manos por parte del personal afecta al tipo y la cantidad de flora bacteriana en sus manos, así como también lo hace la duración del lavado y la cantidad de jabón utilizado(1).

Esta flora bacteriana se divide en:

*Flora transitoria:

Se conforma por organismos débilmente ligados al epitelio externo y se pierden espontáneamente o es eliminada por un simple lavado con agua y jabón (6). A esta flora también se le conoce como flora colonizadora o contaminante y consta

de microorganismos aislados de la piel, pero se ha demostrado no encontrarse persistentemente en la mayoría de las personas. Algunos microorganismos particularmente, algunas bacterias Gram negativas (G-), tales como, *E. Coli*, sobreviven muy probablemente en la piel y se consideran flora no colonizante (4).

*Flora residente:

Vive dentro o sobre de la piel formando una población relativamente estable, tanto en tamaño como en composición, cuando no se encuentran bajo la influencia de agentes antisépticos (6). También se conoce como flora colonizante, son microorganismos persistentemente aislados de la piel en la mayoría de las personas. Estos microorganismos se consideran residentes permanentemente de la piel y no son fácilmente eliminables a través de la fricción mecánica (4). Predominan las especies de *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Streptococcus* y sus cantidades se recuperan rápidamente después de ser eliminados por medios mecánicos (6).

1.4. STAPHYLOCOCCUS:

Los *Staphylococcus* son la causa más común de infecciones localizadas, supurantes en humanos. Fueron descritos por primera vez en 1879 por Kosh, en 1880 Rosenback los clasificó en dos especies: *Staphylococcus (pyogenes) aureus* y *Staphylococcus (pyogenes) albus* y Pasteur los cultivó en un medio líquido en 1889 (7).

1.4.1. Clasificación:

Los estafilococos pertenecen a la familia de *Micrococcaceae*. Dentro del género *Staphylococcus* se localizan 27 especies, dentro de las cuales 6 son las que poseen mayor significado en el campo de la salud pública: *S. aureus*, *S. Epidermis*, *S. Haemolyticus*, *S. Saprophyticus*, *S. Lugdunensis*, *S. Schleiferi*. Cabe mencionar que el *S. aureus* es la única coagulasa positiva, en tanto que las demás especies del grupo de los estafilococos son coagulasa negativos (ECN) o también llamados *Staphylococcus Especie (Sp)*.

1.4.2. Características microscópicas:

Los estafilococos son bacterias cuyo diámetro fluctúa entre 0.8 y 1.0 micras, no poseen ni flagelos ni esporas.

Se agrupa en acúmulos parecidos a racimos de uvas. *Los Staphylococcus aureus* son de color amarillo y los *Staphylococcus Sp* son blancos. Su pared celular consta de una capa externa rica en proteínas y de una capa interna de mucopéptido y, aunque su estructura antigénica tiene poco valor en su identificación, a excepción de la proteína A de los estafilococos coagulasa positiva (ECP), la cual se utiliza para diferenciar a este grupo mediante la reacción pseudoimmune.

1.4.3. Resistencia a agentes físicos, químicos y biológicos:

Los estafilococos figuran entre las bacterias no esporuladas más resistentes, ya que pueden sobrevivir a muchas condiciones ambientales desfavorables durante su camino de un hospedador a otro; son muy resistentes a la luz, temperaturas externas y desecación, por lo cual estos microorganismos se pueden transmitir aún por medio de polvo. Además sobreviven días o semanas en el pus desecado y en el esputo, y pueden resistir calor húmedo hasta de 60°C durante 30 minutos. Adicionalmente, los estafilococos resisten a la acción de los fenoles y la de muchos otros desinfectantes empleados en los laboratorios (cloruro de magnesio, cloruro de benzalconio, etc.).

1.4.4. Características del aislamiento:

a) Medios de cultivo:

Por su minúsculo tamaño, los microorganismos, no pueden estudiarse como individuos, sino es necesario manejarlos como poblaciones. Para ello es necesario cultivarlos, es decir, favorecer su multiplicación *in vitro*, en ambientes especiales que proporcionen las condiciones semejantes a las de sus hábitats naturales. En estos ambientes se debe eliminar a todos aquellos microorganismos de interés, al que además se le deben proporcionar los nutrientes necesarios para su crecimiento y multiplicación (8).

Estos microorganismos se reproducen fácilmente en el laboratorio previa siembra en caldo o agar nutritivos. Su crecimiento en sangre es más abundante y hace posible poner de manifiesto hemolisinas estafilococcicas de acción enérgica, tales como la alfa, beta y gamma, presentes con cierta regularidad en los ECP.

Independientemente de que en el laboratorio se emplea gelosa sangre para lograr el aislamiento de estos microorganismos, se suele adicionar al análisis otros medios de naturaleza selectiva, tal como manitol sal agar, que debe su selectividad a su alto contenido de NaCl-.

b)Condiciones de incubación:

Se desarrollan dentro de límites muy amplios de temperatura (10 a 40°C), aunque su crecimiento óptimo se obtiene entre los 30 y 37 °C. Es importante precisar, que su pigmentación característica solo se manifiesta en ciertas especies, y esta se produce mejor entre los 19 y 25 °C.

Entre 24 a 36 horas, a una presión atmosférica normal de aerobiosis se logra un desarrollo abundante, pero la mayoría de las cepas se reproduce aceptablemente en ausencia de oxígeno; por tal razón, los estafilococos se clasifican como facultativos.

c)Morfología Microscópica:

Guardan semejanza con manchas redondas de pintura y, de acuerdo a la composición de los medios, su diámetro fluctúa entre los 2 y 4 milímetros; además son convexas, de bordes regulares y de consistencia butirácea. En manitol sal agar, las colonias se rodean por halos amarillos, debido a que ocurre fermentación del manitol y su indicador rojo de fenol adquiere aquella coloración al disminuir el pH (9).

1.4.5. Patogenicidad:

Las infecciones estafilocócicas dependen del número y la vía de introducción de los estafilococos, sus productos tóxicos y de la exposición previa a los mismos. En el huésped humano, los factores mediadores son la cantidad de trauma, la salud general, y el estado nutricional del individuo. Factores adicionales son las toxemias, reacciones alérgicas, alteraciones nutricionales y metabólicas de la

desnutrición, diabetes no controlada y, en el sitio de la infección, cambios de la red capilar, el medio bioquímico local y la respuesta inflamatoria.

La piel es el sitio más común de la infección estafilocócica. Las lesiones que se desarrollan varían desde furúnculos moderados localizados, los cuales consisten inicialmente, como un área circunscrita de inflamación que se hace suave en el centro y produce pus, después de lo cual se resuelve por sí solo, con el depósito de tejido de granulación; el carbunco es una enfermedad infecciosa de la piel, semejante al furúculo, pero las ulceraciones son más profundas y afectan áreas más amplias de la piel, acompañándose de fiebre y malestar general. En ocasiones se desarrollan septicemias fulminantes después de algunas infecciones estafilocócicas severas. El paciente se ve bastante enfermo, con fiebre alta, toxemia e irritación del Sistema Nervioso Central. El índice de mortalidad en casos no tratados es mayor del 90%. Si la septicemia persiste, se forman abscesos metastásicos en pulmones, corazón, riñones, vesícula biliar, apéndice, hígado, peritoneo y huesos. La endocarditis es una complicación frecuente de las septicemias estafilocócicas; presentándose meningitis y abscesos cerebrales, la muerte puede presentarse pronto. Las infecciones estafilocócicas del labio superior y de la nariz son en particular peligrosas porque los organismos pueden invadir fácilmente hacia las venas regionales, causando trombosis del seno cavernoso, septicemia y muerte.

En el acné, los estafilococos, junto con los bacilos difteroides complican y agravan los cambios de la piel, y juntos, intervienen en la persistencia y severidad de las lesiones.

El impétigo contagioso, causado por estafilococos es una enfermedad epidémica ocasional en particular de niños. Los estafilococos infectan grandes áreas de la piel causando vesículas o bulas, en vez de circuncribirse tal como ocurre en las características estafilocócicas de la piel (10).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El tipo de tratamientos realizados en cualquier área de la Odontología implica un alto riesgo de exposición, debido al contacto con fluidos (saliva y/o sangre) y mucosas. Tomando en cuenta este hecho, en la práctica clínica en general, es común la utilización de guantes, sin embargo, esto no representa una barrera completamente impermeable; por lo tanto, el lavado de manos es un método de suma importancia para evitar dicha exposición, tanto del paciente como la del operador por algún tipo de microorganismo patógeno, como es el caso del *Staphylococcus aureus*.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

La recolección de datos acerca de la existencia o ausencia de microorganismos patógenos en las manos del operador, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, servirá como base para conocer la realidad de la problemática, sobre el uso de guantes y el lavado de manos. De esta manera se podrán proponer programas educativos sobre el cuidado de las manos en los Profesionales de la Salud Dental.

4. OBJETIVO GENERAL:

Determinar a través de estudios bacteriológicos, la presencia de *Staphylococcus aureus* en la flora bacteriana existente en las manos de los estudiantes que utilizaban guantes vs los que no, previo lavado de manos con jabón con antiséptico, en una Clínica de Protopodencia Total, Facultad de Odontología, UNAM.

4.1.OBJETIVO ESPECIFICO:

- Determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)* de *Staphylococcus sp* (Anexo 2)., recuperados después de un tratamiento en una Clínica de Protopodencia Total.
- Identificar los *Staphylococcus* recuperados mediante pruebas bioquímicas.
- Comparar las UFC de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp* entre los estudiantes que utilizaron vs los que no utilizaron guantes.
- Cuantificar las UFC de ambos.

*Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

Cantidad de microorganismos capaces de formar colonias en un medio de cultivo. Es un método de recuento de células viables (indirectas o cultivables) al postulado básico en que se fundamentan, indica que cualquier célula viable si es inoculada en un medio de cultivo, se multiplica y produce datos de fácil identificación como la formación de colonias en placas de agar.

5. HIPÓTESIS:

H₀:

"La práctica de no utilizar guantes durante la atención bucodental, no contribuye ni disminuye la colonización por *Staphylococcus aureus* en la piel de las manos".

H₁:

"La práctica de utilizar guantes durante la atención bucodental, disminuye la colonización por *Staphylococcus aureus* en la piel de las manos".

H₂:

"No existe diferencia entre utilizar y no utilizar guantes en la colonización de *Staphylococcus aureus* en la piel de las manos, durante la atención bucodental.".

6. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA:

6.1. Tipo de Estudio:

Experimental.

A) Selección de sujetos de estudio:

Alumnos de una Clínica de Prostopodencia Total de la Facultad de Odontología, UNAM.

B) Tipo y tamaño de la muestra

El total de la muestra fue de 20 alumnos, divididos en dos grupos, bajo criterios de inclusión.

C) Selección de variables:

Estudiantes que utilizan guantes

Estudiantes que no utilizan guantes

Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) *Staphylococcus sp*

Pruebas Bioquímicas que diferencian *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp*

D) Criterios de inclusión:

Para el grupo I:

Estudiantes que utilizan siempre guantes durante la atención a pacientes en la Clínica de Prostopodencia Total.

Para el grupo II:

Estudiantes que no utilizan guantes durante la atención a pacientes en la clínica de Prostopodencia Total.

E) Criterios de exclusión:

Para ambos grupos:

*Estudiantes que presenten infecciones en las manos.

*Estudiantes que estén bajo tratamiento antimicótico sistémico y/o tópico.

*Estudiantes que no cumplan con los criterios de inclusión.

F) Método de recolección de datos:

Se elaboró un formato expreso para este estudio, que incluía:

La carta de aceptación informa que no existe ningún riesgo en dicho estudio, ya que se apega a los "Lineamientos Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos" según se contempla en la legislación de los Estados Unidos Mexicanos; también contiene los datos generales (nombre, dirección, teléfono, grupo, firma) de cada uno de los alumnos, así como, fecha de la toma de la muestra (Anexo 1).

G) Procesamiento de los datos:

Los resultados de la cuantificación de las placas, fueron capturados para ser analizados en el paquete estadístico SPSS versión 5.0 para Windows.

H) Análisis Estadístico:

Se aplicó la "t" de Student para comparar el total de UFC entre los dos grupos diferentes, comprobando que si las medias de 2 muestras independientes son significativamente diferentes.

i) Recolección de muestras:

-Técnica de lavado:

Los alumnos mojaron sus manos en el chorro de agua, durante 30 segundos, depositaron 2 mililitros de jabón antiséptico que contiene Gluconato de Clorhexidina al 4 % - Exelle Cottrel Ltd. Antimicrobial Skin Cleanser (Anexo 2)- en una de las palmas de las manos, expandiéndola por todas las superficies. Se frota las yemas de los dedos y las palmas de las mismas, con movimientos circulares. La palma de la mano derecha se frota sobre el dorso de la mano izquierda, se entrelazan los dedos de ambas manos y se frota hacia adelante y hacia atrás. Todos los pasos anteriores se realizaron vigorosamente. Se colocan las manos bajo el chorro de agua por un minuto y se procedió a secarlas con toallas desechables.

Después de atender a sus pacientes, se separaron en dos grupos: alumnos que utilizaron guantes y los que no los utilizaron.

La técnica descrita por Larson et al (11), consiste en sumergir cada mano en 15 mililitros de caldo Lethen Broth (Anexo 3), en una bolsa de polietileno esterilizada con rayos gamma -2.5 megahertz (Anexo 4)-, dando un ligero masaje por todas las superficies de la mano durante 30 segundos, se retira la bolsa, se cierra y se agita vigorosamente durante 30 segundos para neutralizar el efecto residual de jabón de las manos y se transporta al laboratorio dentro de una hielera portátil.

J) Técnicas de cultivo:

Las muestras fueron procesadas dentro de las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM

-Siembra en placa:

Se tomó 0.1 mililitro de la muestra y se inoculó por duplicado en cajas de petri que contengan 15 mililitros de Mannitol Salt Agar (Anexo 3), con la técnica de barrido o rodillo, incubándose a 37°C en condiciones aerobias por 48 horas.

K) Pruebas de identificación:

-Detección del género:

Una vez efectuado el aislamiento de colonias sospechosas de estafilococos y tras haber transcurrido 48 horas, se revisaron las placas para observar la morfología y color de las colonias en el Agar. Se hizo la observación de extensiones teñidas al Gram para ver si pertenecían a este género (Anexo 5)-Figura 3-. Después se procedió a realizar la prueba de la catalasa (Anexo 5), la cual consistió, en colocar en un portaobjetos una asada del microorganismo, y verter una o dos gotas de H₂O₂ al 30 %. La reacción solo tomó unos segundos para que la solución entrara en contacto con las células y se empezaran a notar burbujas ocasionadas por el O₂ que se desprende.

-Diferenciación de la especie:

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente como estafilococos, puede procederse a determinar la especie correspondiente, con la prueba de la coagulasa, para así determinar si se trata de *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus sp.*

-Prueba de la coagulasa (Anexo 5):

Para llevar a cabo la prueba, se adicionaron asépticamente 0.5 ml de plasma de conejo en un tubo de ensayo estéril, al que posteriormente le fueron agregados 0.5 ml de cultivo líquido y puro de 18 a 24 horas del microorganismo analizado; los componentes se mezclaron rotando el tubo y se procedió a incubar a 37 °C hasta que se observó la formación, bien sea de redes de fibrina o de un coágulo.

7. RECURSOS

7.1. Financieros:

Los gastos correrán a cargo de los tesisistas, apoyados por la infraestructura del Laboratorio de Microbiología de la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

7.2. Humanos:

Dos tesisistas

Un tutor de el Laboratorio de Microbiología

Un asesor de el Laboratorio de Microbiología

7.3. Materiales:

equipo de Computo

fotocopiadora

campana de flujo laminar

refrigerador

microscopio de luz

contador de colonias

agitador magnético

báscula granatoria

micropipeta (1000 microlitros)

puntas de micropipeta (1000 microlitros)

pipeteador

fotomicroscopio Axiophot

termometro

7.3.1. Medios de cultivo:

Medium Mannitol Salt Agar

Lethen Broth Dehydrated

7.3.2. Pruebas de identificación:

-tinción de Gram:

azul violeta, lugol, alcohol-cetona, safranina.

-catalasa:

Peróxido de Hidrógeno al 30%

-coagulasa:

plasma de conejo

7.3.3. Cristalería:

80 cajas de petri de plástico desechable

2 pipetas

120 tubos de ensayo

5 matraces Erlenmeyer de 2 litros

*Otros:

80 bolsas de polietileno

250 hojas de papel

10 lápices

rollo de gasa

1 paquete de algodón

cinta masking tape

plumón indeleble

tijeras

pinzas

clips

8. RESULTADOS:

8.1. Análisis de resultados:

Tabla 1:

Distribución de las UFC en manos con guantes.

	Mano Derecha			Mano Izquierda		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp</i>	Total UFC	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp</i>	Total UFC
1	20	44	64	17	7	24
2	302	274	576	234	244	478
3	280	146	426	170	140	310
4	5	3	8	13	9	22
5	412	116	528	368	114	482
6	5	19	24	15	9	24
7	27	15	42	11	26	36
8	320	280	600	168	284	452
9	140	48	188	312	128	440
10	48	4	52	48	16	64
Total	1559	949	2508	1356	977	2332
Media	155.90±49.64	94.90±33.83	250.80±79.41	135.60±42.67	97.70±32.40	233.20±68.15
DS	156.97	106.99	251.12	134.94	102.66	215.51

Tabla 2:

Distribución de las UFC en manos sin guantes.

	Mano Derecha			Mano Izquierda		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp</i>	Total UFC	<i>S. aureus</i>	<i>S. sp</i>	Total UFC
1	11	4	15	57	18	75
2	100	7	107	72	16	88
3	20	2	22	30	14	44
4	247	238	485	173	63	236
5	16	5	21	55	0	55
6	372	0	372	94	112	206
7	68	32	100	7	4	11
8	200	4	204	240	8	248
9	1200	120	1320	800	8	808
10	320	176	496	320	140	460
Total	2554	588	3142	1848	383	2231
Media	255.40±112.78	58.80±27.60	314.20±129.44	184.80±75.25	38.30±15.76	223.10±77.80
DS	356.66	87.29	399.86	237.97	49.80	246.03

Tabla 3:

Comparación entre las UFC de los 2 grupos para conocer si hay diferencia significativa de *Staphylococcus aureus* en la mano derecha:

Con guantes	155.90±49.64
Sin guantes	255.40±112.78
Diferencia entre Medias	-99.50
"T" Student	P=0.3326

Tabla 4:

Comparación entre las UFC de los 2 grupos para conocer si hay diferencia significativa de *Staphylococcus sp.* en la mano derecha:

Con guantes	94.90±33.90
Sin guantes	58.80±27.60
Diferencia entre Medias	36.10
"T" Student	P=0.487

Tabla 5:

Comparación entre el total de las UFC de los dos grupos en mano derecha:

Con guantes	250.80±79.41
Sin guantes	314.20±129.44
Diferencia entre Medias	63.40
"T" Student	P=0.519

Tabla 6:

Comparación entre las UFC de los 2 grupos para conocer si hay diferencia significativa de *Staphylococcus aureus* en la mano izquierda:

Con guantes	135.60±42.67
Sin guantes	184.80±75.25
Diferencia entre Medias	-49.20
"T" Student	P=0.419

Tabla 7:

Comparación entre las UFC de los 2 grupos para conocer si hay diferencia significativa de *Staphylococcus sp* en la mano izquierda:

Con guantes	97.70±32.46
Sin guantes	38.30±15.76
Diferencia entre Medias	59.40
"T" Student	P=0.025

Tabla 8:

Comparación entre el total de las UFC de los dos grupos en mano izquierda:

Con guantes	233.20±68.15
Sin guantes	223.10±77.80
Diferencia entre Medias	77.80
"T" Student	P=0.625

*Gráficas 1-2 (pag 38).

9. DISCUSIÓN:

El propósito primario del lavado de manos es el de reducir la población de patógenos potenciales de las manos, removiendo la carga biológica macro y microscópicamente acumulada con respecto a las rutinas no quirúrgicas, procedimientos dentales, etc (12). Es muy importante el lavado de manos antes y después de quitarse los guantes; dado a que cuando la piel esta cubierta con éstos, los miembros de la flora residente, y en una cantidad menor de la flora transitoria, crecen dramáticamente. Este aumento puede darse hasta en una cifra de 1 a 4000 más microorganismos en una hora.

Este alto incremento, se debe al calor y el ambiente presente bajo los guantes, lo cual puede provocar irritación en la piel. El lavado de manos antes del enguantado, reduce el número microorganismos iniciales antes del procedimiento dental y, el lavado de manos después de retirar los guantes reduce el número de aquellos que pudieron haberse incrementado, así como los microorganismos transitorios, que pueden tener contacto con la piel a través de los defectos del guante. La rutina de utilizar un jabón con agente antiséptico de efecto prolongado mantiene un nivel bajo de microorganismos de la piel (13).

Equivocadamente el Cirujano Dentista tiene la idea de que los guantes representan una barrera impermeable; sin embargo, existes estudios que avalan lo contrario (3). En la Clínica de Prostodoncia donde se llevó a cabo la toma de muestras, a pesar de la recomendación de la utilización de guantes, se permite trabajar sin estos, debido a los materiales y tratamientos utilizados. El 100% de los alumnos participantes son diestros, presentaron uñas cortas, sin barniz y no portaban joyería.

Después de la experiencia adquirida a través de los resultados obtenidos en este estudio, y de la literatura consultada, se recomienda poner en consideración los siguientes puntos:

-Secado de las manos:

Existe una variedad de métodos para el secado de las manos. Las toallas de tela son raramente usadas en los Centros de Cuidado de la Salud por aspectos concernientes a la contaminación. Aunque los secadores de aire tibio se usan en muchos lugares públicos, raramente se hallan en áreas de cuidado a pacientes. La investigación no abunda, pero un estudio comparativo entre toallas de tela, de papel y secador con aire tibio, se encontró que los 3 métodos daban como resultado una reducción adicional de flora, siendo el secado a través de aire caliente el que produjo una mayor disminución y el secado con toallas el menor. Otro estudio no encontró diferencia en el número de bacterias restantes después del uso de toallas de papel y de aire tibio; sin embargo, generalmente toma más tiempo secarse las manos con un secador de aire caliente y la mayoría de ellos tienen ciclos establecidos de 30 segundos que pueden ser inadecuados. El ruido asociado a los secadores de aire, también puede provocar problemas en las áreas de cuidado a pacientes. Las toallas de papel deberían ser colocadas cerca del lavabo en un área que no resulte contaminada al poder ser salpicada

-Uñas, barniz de uñas, y uñas postizas:

El personal dental debería de utilizar las uñas cortas, ya que la mayor parte de la flora de las manos se halla bajo y alrededor de las estas. Además, las uñas largas pueden causar que colocar los guantes sea más difícil y generar que los guantes se rompan con más facilidad.

El barniz aplicado a las uñas naturales parece no tener detrimento de los montos microbianos, tanto en uñas largas como cortas. Un barniz claro es preferible, por que los colores fuertes pueden oscurecer el espacio subungueal, reduciendo la tendencia a una limpieza cuidadosa.

Al separar las uñas artificiales de las naturales, se encontraron altos índices de colonias.

También se ha expresado la inquietud acerca de que el uso de uñas postizas y de barniz de uñas puede desanimar fuertemente el lavado de manos.

-Accesorios de Joyería:

Los conteos totales de bacterias son más altos cuando se usan anillos, aunque Jacobson y cols. no encontraron que los anillos interfirieran en la eliminación de la bacteria por medio del lavado de manos. Pero de lo que sí se tiene certeza, es de que estos implementos pueden hacer más difícil el momento de ponerse los guantes y pueden causar que estos se rompan más fácilmente.

-Aislamiento y distribución de los productos para el cuidado de las manos.

Estos productos, incluyendo tanto el jabón ordinario como los productos antisépticos, pueden contaminarse o apoyar el crecimiento de los microorganismos. El jabón de barra debería ser distribuido en trozos pequeños que puedan ser cambiados frecuentemente, con jaboneras que permitan el drenaje. Los productos líquidos deberían almacenarse en contenedores cerrados y tomarse de dispensadores desechables o unos que pudieran ser lavados y secados por completo antes de volver a llenarse. Se ha sugerido, que los dispensadores deberían ser operados mediante el pie o el codo, para disminuir el riesgo de contaminación.

-Complicaciones en el lavado de manos y el uso de guantes:

El lavado de manos puede generar efectos adversos a la salud de la piel. Algunos de estos efectos ocurren debido a los productos empleados; otros se deben a reacciones alérgicas en los ingredientes de varios agentes para el lavado de manos.

De forma contraria a la opinión pública, los antisépticos no causan necesariamente un daño mayor a la piel, que el que generalmente generan los jabones ordinarios; a menudo el detergente base es el que causa aspereza.

Recientemente, debido al incremento de uso de guantes, también ha aumentado los reportes de reacciones alérgicas ante los de látex. La dermatitis en los

encontrarse en mayor riesgo de exponerse a los patógenos transmisibles por contacto con fluidos corporales, dado que la piel no mantiene su integridad.

-Nuevas tecnologías:

Se ha propuesto el uso de aditamentos para mejorar el seguimiento y la técnica de lavado de manos. En una prueba se usaron lavabos cuya corriente de agua y suministro de jabón eran controlados por sensores electrónicos, lo cual mejoró la calidad del lavado de manos, pero fueron evitados por el personal durante etapas de mucho trabajo. Recientemente se probó el uso de guantes en su baño de clorhexidina en su superficie interna.

Indudablemente se han desarrollado y promovido otros implementos como soluciones al bajo cumplimiento de las recomendaciones para el lavado de manos, pero todos ellos requiere evaluación en ámbitos clínicos para determinar su efectividad.

-Técnica recomendada para el lavado de manos.

Debe de ser realizado antes y después de cada sesión clínica

1. Remover los accesorios de joyería y colocarlos en un contenedor.
2. Se deben mojar las manos y la porción baja del brazo utilizando agua fría.
3. Aplicar jabón con antiséptico, que de preferencia este contenido en un dispensador que pueda ser activado con algún movimiento o con alguna parte del cuerpo que no sean las manos.
4. Lavar las palmas de las manos.
5. Lavar el anverso de las manos.
6. Lavar interdigitalmente.
7. Lavar la punta de los dedos, y dar mayor atención al área de las uñas.
8. Enjuagarse completamente las manos con agua fría.
9. Las manos deben de ser secadas con toallas de papel.
10. Si se tiene alguna herida, esta debe de ser cubierta con material que sea resistente al agua.
11. Si el lavabo no cuenta con un dispositivo electrónico, se debe de tomar una toalla de papel desechable para evitar contaminar con las manos la llave.

10. Si se tiene alguna herida, esta debe de ser cubierta con material que sea resistente al agua.

11. Si el lavabo no cuenta con un dispositivo electrónico, se debe de tomar una toalla de papel desechable para evitar contaminar con las manos la llave.

12.No se deben utilizar toallas de tela o barras de jabón, dado que estas son insuficientes y antihigiénicas(4).

10. CONCLUSIONES

A pesar de que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la práctica de usar y no usar guantes, es necesario la utilización de estos ya que existen lineamientos que sustentan el uso de los mismos, dado que el Cirujano Dentista está en contacto directo con fluidos bucales y los guantes representan una barrera para disminuir la entrada de microorganismos por heridas, erosiones o alergias. Por lo tanto, el lavado de manos es de suma importancia ya que por medios mecánicos y con jabón con antiséptico, se disminuye la flora bacteriana presente y así mismo el riesgo de infección.

Debido a esto, resulta necesario la implantación de Programas Educativos sobre Control de Infecciones en Escuelas y Facultades de Odontología, ya que se observó en este estudio la falta de conocimientos necesarios para poder manejar los factores antes expuestos durante la atención bucodental.

11:ANEXOS:

ANEXO 1:

FORMATO DE ACEPTACIÓN PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

"DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN LAS MANOS DE LOS ESTUDIANTES DE UNA CLÍNICA DE PROSTODONCIA TOTAL"

Yo, _____, declaro no tener inconveniente en participar en la investigación que se está realizando. La cual se llevará a cabo en la Clínica de Prostodoncia Total de la Facultad de Odontología de la UNAM. Cuyo objetivo es determinar mediante la utilización de medios de cultivo, la presencia de *Staphylococcus aureus* en la flora existente en las manos del operador después de la atención dental y, que por someterme a estas pruebas no correré ningún peligro. También declaro no estar bajo tratamiento antimicótico sistémico, ni tener ninguna infección en las manos. Podré solicitar información adicional acerca del estudio, cuando yo lo solicite.

Dirección: _____ Grupo: _____

Teléfono: _____ Fecha: _____ Firma: _____

Tiempo cronometrado del lavado de manos: _____

-JABÓN CON GLUCONATO DE CLORHEXIDINA (GCH):

Fue utilizado como desinfectante en Europa y Canadá durante varias décadas antes de su parovechamiento en Estados Unidos en la década de 1970. La clorhexidina es una bisbiguanida catiónica, que debe su acción antimicrobiana al causar disrupción de las membranas celulares microbianas y la precipitación de sus contenidos. Aunque tiene un amplio espectro de actividad, el GCH es más efectivo contra las bacterias G+ que con las Gram -. La acción contra los bacilos tuberculosos es mínima. El GCH es solamente un inhibidor bueno de hongos, pero in Vitro, es activo contra virus, incluyendo a le VIH, el virus de la herpes simple, el citomegalovirus y el de la influenza.

Numerosos estudios con animales, así como datos provenientes de varias décadas de estudio con seres humanos, indican que el GCH no es tóxica, aún cuando es usada en la piel de recién nacidos. La absorción por parte de la piel es mínima. Sin embargo, puede haber ototoxicidad si se hace llegar al oído medio, y puede provocarse daño corneal si se instala en el ojo. Tiene un potencial de irritación en la piel relativamente bajo.

Tiene fuerte afinidad con la piel, permanecienco químicamente activa durante 6 horas por lo menos. Probablemente tiene el mejor efecto de persistencia de los agentes actualmente disponible para el lavado de manos. Después de haber transcurrido pocos días de uso diario, la producción de bacterias en las manos es muy baja.

La acción del GCH no se ve afectada por la sangre o cualquier otro material orgánico. Sin embargo su actividad depende del pH (5.5 a 7.0) y se reduce o neutraliza en presencia de cationes inorgánicos (fosfato, nitrato y cloruro), y otras sustancias presentes en el agua corriente y en muchas preparaciones farmacéuticas, así como en cremas para las manos y aniones orgánicos, tales como jabones naturales. Por esta razón, la actividad del GCH es particularmente

dependiente de la fórmula y puede recibir la influencia de diferencias individuales en el pH de la piel, secreciones y nivel de humedad. Aunque los datos de la eficacia son difíciles de interpretar en términos de impacto clínico, los usuarios pueden desear comparar datos respecto a la reducción de la flora al decidir que formulación utilizar. El potencial para el desarrollo de resistencia bacteriana al GCH parece bajo, pero ha sido reportado.

Actualmente el GCH se ofrece en varias fórmulas, siendo la más común al 4% en una base detergente, siendo esta presentación la utilizada en este estudio (4).

ANEXO 3

CALDO LETHEEN BROTH Y MEDIO DE CULTIVO MANNITOL SALT AGAR:

-Lethen Broth (DIFCO LABORATORIES):

Es un material muy hidrosfópico, por lo tanto el envase se debe mantener muy bien cerrado y guardarlo a 28°C.

Este caldo separa y diferencia *Staphylococcus aureus*. Sirve también como neutralizante de los residuos de jabón que no pudieron ser eliminados con la técnica de lavado de manos.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Bacto peptamina	10
Extracto de azúcar	5
Lecitina	0.7
Tween 80	5
Cloruro de Sodio	5

pH final 7.0

Se utilizaron 15 mililitros de agua bidestilada y 385 gramos de Lethen Broth y se hirvió hasta disolver. Se debe esterilizar en autoclave de 15 a 20 minutos, a 121°C a 15 libras de presión.

-Mannitol Salt Agar (DIFCO LABORATORIES):

Es un material muy hidrosfópico, por lo tanto el envase se debe mantener muy bien cerrado y guardarlo a 30°C.

Sirve para separar y diferenciar *Staphylococcus aureus* por fermentación de manitol.

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Extracto de carne	1.0
Mezcla de peptonas	10.0
Cloruro de Sodio	75.0
D-Manitol	10.0
Agar	15.0
Rojo Fenol	0.025
pH final 7.4 +/- 0.1	

Se utilizaron 2.7 gramos de este medio diluidos en agua bidestilada y se hirvió hasta disolver. Se debe esterilizar en autoclave de 15 a 20 minutos, a 121° C a 15 libras de presión.

ESTERILIZACIÓN CON RAYOS GAMA:

Para poder llevar a cabo la esterilización de las bolsas de polietileno, se acudió al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

-Características de los Rayos Gamma:

- 1) No existe ninguna restricción en cuanto al material que se vaya a esterilizar.
- 2) Pueden penetrar a cualquier parte del producto.
- 3) No afecta la presentación del producto (empaquete) ni comprime el material
- 4) Es muy confiable, no necesita pruebas posteriores microbiológicas, ni estar en un proceso de cuarentena, ni un proceso de postesterilización.
- 5) Es económico en grandes y pequeñas cantidades .

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN:**-Tinción de Gram:**

Fuè desarrollada empíricamente hacia 1884 por el danés Chistian Gram; posteriormente se determinó que se basa en la composición de la pared celular. Consiste en aplicar 4 reactivos, el cristal violeta o colorante primario, el primer reactivo de la serie Gram; éste imparte color a todos los microorganismos del frote; el segundo reactivo es una solución de yodo o lugol, este actúa como mordente (aumenta o refuerza la unión entre el colorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta-yodo-nucleato de magensio); el tercer reactivo es el alcohol acetona, actúa como decolorante disolviendo y arrastrando fuera de las células al colorante primario; la safranina es el cuarto reactivo, también llamado colorante de contraste. Las bacterias que retienen el colorante primario a lo largo de todo el proceso y no reaccionan con el colorante de contraste son llamadas Gram Positivas (G+), estas se ven teñidas de morado; el segundo grupo de bacterias pierden el colorante primario, reaccionan con el colorante de contraste y se denominan Gram Negativas (G-), éstas se tiñen de rojo(10).

Sin embargo, en caso de persistir algunas dudas, pueden recurrirse a la realización de la prueba de la catalasa, para diferenciar a estos microorganismos que la dan positiva.

-Prueba de la catalasa:

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Químicamente es una hemoproteína bastante similar a la hemoglobina, con la diferencia de que los cuatro átomos de hierro contenidos en su molécula, se encuentran en su estado más oxidado (Fe^{+++}), mientras que en la hemoglobina lo están en estado reducido (Fe^{++}).

La reacción catalizada por la catalasa es:



-Diferenciación de la especie:

Una vez que el aislamiento se ha identificado plenamente como estafilococos, puede procederse a determinar la especie correspondiente, con la prueba de la coagulasa, para así determinar si se trata de *S. Aureus* o ECN.

-Prueba de la coagulasa:

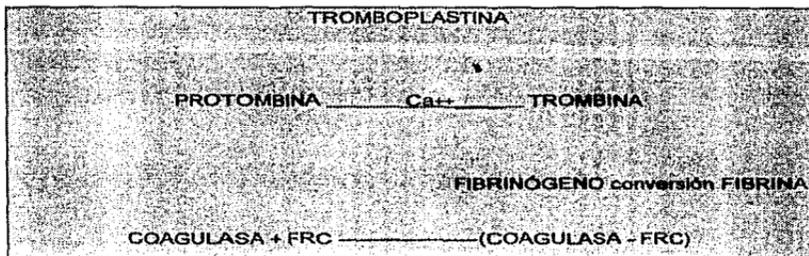
La coagulasa es una proteína de composición química desconocida y que resulta relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 minutos; es muy sensible a la acción de enzimas proteolíticas y, como posee una actividad similar a la de la protombina -que la capacita para convertir fibrinógeno en fibrina, aun cuando en el medio de reacción se encuentren ciertas sustancias anticoagulantes-, permite que el infectólogo la detecte mediante reacciones simples.

En cuanto a su función *in vivo*, ésta consiste principalmente en intervenir la fagocitosis, debido a que genera la producción de redes de fibrina alrededor de los microorganismos impidiendo que el fagocito entre en contacto con ellos para englobarlos; sin embargo al parecer también neutraliza la actividad antimicrobiana que el suero normal manifiesta contra los agentes infectantes.

Mecanismo de acción:

Induce la activación de un mecanismo alterno de coagulación habilitando a un componente del plasma, denominado factor reactivo de la coagulasa o FRC, para convertir el fibrinógeno en fibrina. La coagulasa es una sustancia muy parecida a la protombina que al reaccionar con el FRC, forma un compuesto muy parecido a la trombina. Este paso es decisivo porque, como es sabido, es la trombina la activa al fibrinógeno para formar fibrina en el proceso normal de la coagulación.

De acuerdo a lo anterior, la coagulasa origina la coagulación del plasma en dos pasos: inicialmente se verifica una reacción entre la enzima producida por el microorganismo y el FRC y, posteriormente, las redes de fibrina son producidas por efecto del complejo formado por el paso anterior.



Como se puede observar, existe una coincidencia y una diferencia entre los mecanismos de la coagulación sanguínea y el que implica a la coagulasa: ambos requieren de fibrinógeno, pero el que implica a la enzima estafilocócica no necesita de la presencia de iones Ca^{++} .

En este sentido debe recordarse que el plasma -a diferencia del suero- siempre contiene algún anticoagulante que mantiene atrapado al Ca^{++} . De esta manera, el hecho de que ocurra la coagulación durante la prueba, permite acreditar al microorganismo como productor de coagulasa. Sin embargo, para que lo anterior se considere como posibilidad única, es necesario que la cepa analizada sea pura, ya que otros microorganismos podrían utilizar como fuente de carbono y, al degradarlo, la consecuente liberación de Ca^{++} reactivaría la ruta que se presenta en el organismo.

La reacción se considerará positiva si ocurre cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias coagulasa fuertemente positivas pueden producir el coágulo dentro de las primeras cuatro horas, razón por lo que es recomendable leer el resultado a intervalos de 30 minutos, ya que el *S. Aureus*

también produce fibrinolisin, y la acción de estas puede destruir el coágulo provocando la obtención de resultados falsos negativos cuando se toman lecturas en lapsos mayores. Otras cepas de *S. aureus* solo son capaces de producir suficiente cantidad de coagulasa hasta que transcurren cerca de 18 horas. Por tal motivo, es conveniente revisar nuevamente a las 24 horas los cultivos que en los primeros tiempos se observen como coagulasa negativa.

Es importante hacer notar que, a mayor virulencia de la cepa analizada, menor será el tiempo en que la prueba será positiva (11).



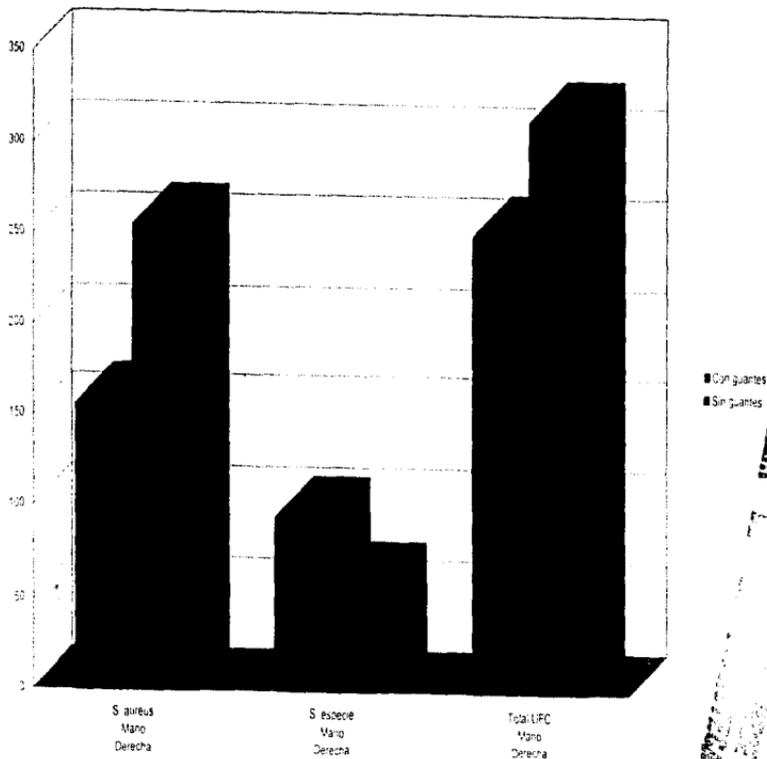
Figura 1

Figura 2

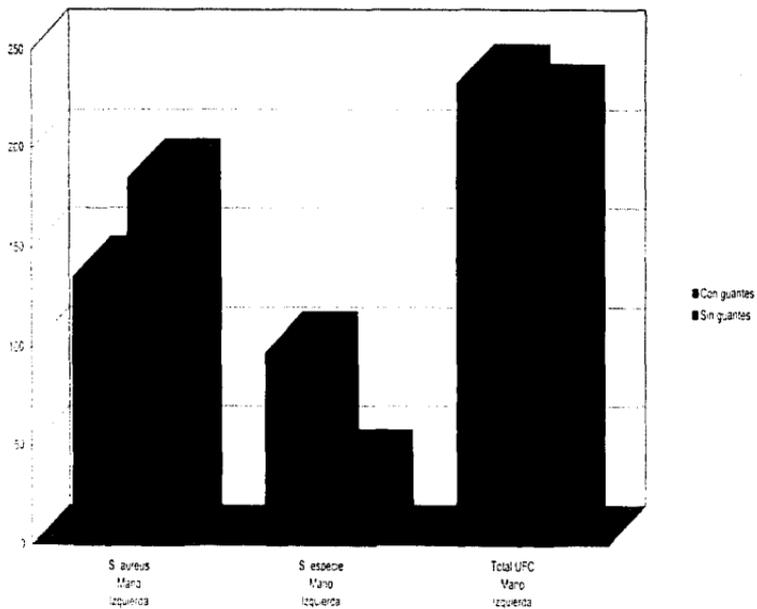


Figura 3

13 GRÁFICAS.



ESTABLECIMIENTO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y SEROLOGÍA
BOULEVARD DE LA AMÉRICA DEL SUR
CAROLINA, VENEZUELA



12. BIBLIOGRAFIA

1. Larson Elaine, Mc Geer Allison, Quraishi Ahmed, et al. Effect of an Automated Sink Handwashing Practices and Attitudes in High Risk Units. *Journal of Infection Control and Hospital Epidemiology*. July 1991.
2. Mayer Joni A., Dubbert Patricia M., Miller Mary, Burkett Paul A., Chapman Stanley W. Increasing Handwashing in an Intensive Care Unit. *Journal of Infection Control* 1987 Vol 7 N° 5
3. Lund S, Jackson R., Legget J., Hales L., Dworkin R., Gilbert D Reality of glove use and handwashing in a community hospital. *American Journal of Infection Control* 1994, Vol 7 N° 22.
4. Larson Elaine L. Apic Guideline for hand washing and hand antiseptics in health care settings. *American Journal of Infection Control* Aug. 1995 vol. 23 No. 4.
5. Molinari John A. Handwashing and Hand Care: Fundamental Asepsis Requirements. *Dental Infection Control Forum*. September 1995 Vol 16 N° 3.
6. Miller Chrish, PhD; Palenik Charles John, M.S., *Infection Control and Management of Hazardous Materials for the Dental Team*. Ed. Mosley Year Bo 1a. Edición . St. Louis Missouri, United States of America, 1994.
7. Wood Peter r. Bchd. *Cross Infection Control in Dentistry: A Practical Illustrated Guide*. Ed. Mosby Year Book. 1a de London England 1992.
8. Guenther Sharon, Hendley Owen, Wenzel Richard. Gram-Negative Baciles as Non-Transitory Flore on the Hand of Hospital Personnel. *Journal of Clinical Microbiology* Mar. 1987,p 488-490.
9. Mac Faddin Jean. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia cx*. Ed. Panamericana 1a. Edición. México D.F. 1991.
10. Ramírez Gama R. M., Luna Millán B., Chávez Mejía A. et al. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. facultad de Química UNAM 1995 pp 48 68.
11. Velasco Garza Raúl. *Manual de prácticas Bacteriológicas* . Facultad de Química . (Depto. de Biología U.N.A.M.) 1989
12. Larson Elaine L., Stromm Mark S., Evans Charles A. Analisis en Three Variables in Sampling Solutions Used to Assay Bacteria of Hands. Type of Solution, Use of Antiseptic Neutralizers, and solution Temperature. *Journal of Clinical Microbiology* Sept 1980. P 355-36 vol. 12 No. 3.

13. Burnet George W., Scherp Herry W., Shuster George S., Manual de Infecciones de la Boca. Ed. Limusa 2ª Reimpresión Tomo III México 1988, pp 493-506