

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN BACTERIANA DE LA SUPERFICIE DE LAS MANOS

García Miranda Sarahi Montserrat (1), Deveze Álvarez Martha Alicia (2), Mendoza Macías Claudia Leticia (3)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad De Guanajuato,] | Dirección de correo electrónico: [saragami18@gmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [devezem@ugto.mx]

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [cl.mendoza@ugto.mx]

Resumen

La transmisión de bacterias transitorias por las manos juega un papel importante en las transmisiones de enfermedades. Para la evaluación de la microbiota transitoria, existen métodos microbiológicos que dependen del tipo de muestreo. Por lo anterior se implementó una metodología de hisopado directo para evaluar cuantitativamente las bacterias de la superficie palmar de manos y la comparación con la metodología de enjuague así como el efecto de una solución neutralizante sobre dicho proceso. Se compararon ambas técnicas calculando las UFC/mano para microorganismos totales, enterobacterias y estafilococos, así como también para la validación de dichas metodologías se empleó un método de contaminación de manos con una carga bacteriana fija; se observó una eficiente recuperación en bajas concentraciones de microorganismos con el método de hisopado mientras que el de enjuague tuvo una mejor eficiencia en superficies palmares más contaminadas; en la metodología de contaminación con *E. coli* se observó que el lavado de manos previo a la toma de muestra afecta en el proceso de recuperación bacteriana aún en presencia de un agente neutralizante. Por lo anterior la metodología de hisopado permite una recuperación mayor en superficies palmares con carga bacteriana baja.

Abstract

Transient bacteria transmission by hands plays an important role in the transmission of disease. For the evaluation of the transient microbiota, microbiological methods according to the sampling are available. Therefore a methodology of direct swabbing for quantification of bacteria on palmar surface was proposed. Comparison with standard reference rinse methodology and the effect of a neutralizing solution on this process was implemented. Both techniques were compared by calculating CFU / hand for total, *Enterobacteriaceae* and *Staphylococci* microorganisms as well as a validation with a contamination of hands with a fixed bacterial load; efficient recovery at low concentrations of microorganisms in the method of swabbing was observed meanwhile rinse methodology observed a better efficiency in polluted palmar surfaces; in the methodology of contamination with *E. coli*, prior hand wash affected the bacterial recovery even in presence of neutralizing agent. Based on this results swabbing methodology allows bacterial recovery on palmar surfaces with low bacterial load.

Palabras Clave

1; Palma 2; Recuento 3; *Escherichia coli* 4; Enjuague 5; Neutralizante

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la higiene de las manos se considera la mejor estrategia y la más costo-efectiva en la prevención de infecciones asociadas al cuidado de la salud [1]. La transmisión de bacterias transitorias por las manos juega un papel importante en las transmisiones directas e indirectas de enfermedades. El concepto de higiene de manos data del siglo XIX. En 1846 el Dr. Ignaz Semmelweis, demostró por primera vez que lavarse las manos con frecuencia ayuda a prevenir la propagación de las enfermedades; su trabajo es considerado el primer análisis epidemiológico. [2]

La piel esta normalmente colonizada, entro los microorganismos presentes se tiene: Microbiota residente, aquellos microorganismos persistentes o permanentes en la piel de la mayoría de las personas (*Staphylococcus coagulasa negativo*), *corinebacterium*, difteroides), en algunas oportunidades se incorpora el *Staphylococcus aureus* o *Candida spp* cuando la piel se presenta lesionada, siendo difíciles de erradicar y transformándose en importante fuente de contaminación y transmisión; microbiota transitoria, bacterias que pueden ser adquiridas (*E. coli*, Cocos Gram positivos multiresistentes, *Candidas*, *Enterococos* y bacilos Gram negativos multiresistentes. [3].

Para la evaluación de la microbiota transitoria, que es la responsable de la transmisión de enfermedades, existen métodos microbiológicos que dependen del tipo de muestreo. La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

-Método del hisopo: se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares y otros.

-Método de la esponja: Se utiliza para muestrear superficies de mayor área

-Método del enjuague: Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para superficies interiores. [4]

Los métodos actuales no proporcionan un medio para evaluar la transmisión de bacterias a los objetos después de lavarse las manos. [5]. El desarrollo de nuevas técnicas para entender mejor y evaluar la eficacia relativa de los productos de lavado de manos proporcionará datos significativos y útiles para ayudar a reducir la

incidencia de la enfermedad por transmisión mano. [6]

Por lo anterior el presente trabajo pretende validar una metodología de hisopado directo para evaluar cuantitativamente las bacterias de la superficie palmar de manos y realizar la comparación con la metodología de referencia que es el enjuague. [6]. Así mismo ver el efecto de la adición de un agente neutralizante para la recuperación de microorganismos en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones empleadas

En la toma de muestra se utilizó una solución de NaCl de 0.85% y como agentes neutralizantes se incorporaron Tritón x-100 (Sigma ®) y Tiosulfato de sodio (Técnica Química S.A) a una concentración de 0.1%.

Sujetos Humanos

Las poblaciones de ensayo fueron sujetos sanos de ambos sexos, de entre 20 – 23 años de edad. Todos los sujetos autorizaron su participación y fueron instruidos en las técnicas de contaminación bacteriana. Todos los estudios realizados en los que se utilizaron bacterias para contaminar las manos de los sujetos son protocolos seguros para los voluntarios ya que las bacterias utilizadas no se consideran de riesgo ya que son no patógenas.

Microorganismo y condiciones de crecimiento

La especie bacteriana utilizada en las pruebas de contaminación bacteriana fue *Escherichia coli* no patógena, que fue cultivada en medio líquido Luria Bertani (BD Bioxon ®) a 37°C por 18 horas y 180 rpm, con un título de aproximadamente 1×10^9 UFC/ml. Para aislar la microbiota normal transitoria de los voluntarios, se utilizaron placas con agar nutritivo. Macconkey, Sal y manitol (BD Bioxon ®) para los microorganismos totales, Gram negativos y estafilococcos, respectivamente. Todas estas se incubaron a 37°C por 24 horas.

Método de contaminación

Se transfirió un volumen de 0.2 ml de la suspensión de *E. coli*, a las manos de los voluntarios, quienes para distribuirlo se frotaron las manos por 30 seg para posteriormente dejar secar al aire por 3 minutos y finalmente evaluar la recuperación bacteriana por los métodos de hisopado y enjuague.

Métodos de recuperación bacteriana en superficies vivas

a) Método de Hisopado

Se realizó de acuerdo a lo descrito previamente en el grupo de trabajo [7] que brevemente consiste en hacer rodar un hisopo estéril humedecido con solución salina en movimientos horizontales por toda la superficie de la palma seguido por movimientos verticales a lo largo de los dedos y contorno de la mano y finalmente alrededor de las uñas. Las muestras recolectadas se depositaron en tubos con 1 ml de solución salina estéril, para la inoculación directa o por dilución (1:10) en agar nutritivo para el recuento bacteriano a las 18 h de incubación.

b) Método de Enjuague

Se utilizó la metodología de referencia de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) Método E1174 (Método Estándar para la Evaluación de la Atención de la Salud Personal Lavado a mano formulaciones) [8] que brevemente consiste en utilizar bolsas de plástico de 18x26 cm estériles en las que se agregó 25 ml de solución salina estéril. Se solicitó a los voluntarios colocar la mano y enjuagaron únicamente la palma sobre una superficie plana. Se recuperó 1 ml de la solución de enjuague para su inoculación directa o por dilución (1:10) en agar nutritivo para el recuento bacteriano a las 18 h de incubación.

Evaluación del efecto de neutralizantes en la recuperación bacteriana

Se recolectaron las muestras de la superficie de la palma de la mano mediante hisopado y con una plantilla estéril de 7x4 cm; el hisopo se humedeció en 1 ml de solución con y sin agentes neutralizantes. La muestra tomada se inóculo directamente en placas de agar nutritivo para su posterior recuento bacteriano.

Cálculos y Análisis estadístico

Se contaron las colonias recuperadas en las placas y se calculó las UFC/mano para cada muestra. Para establecer las diferencias entre las metodologías evaluadas así como para el efecto de neutralizantes, los datos de UFC/mano se normalizaron al convertirse a valores log₁₀ para un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA)

que se realizó con el programa JMPIN versión 4.0.3 (SAS Institute Inc.). Se consideraron significativas aquellas con un valor de $P > 0.05$.

Descontaminación de la mano

Tras la finalización de las pruebas los voluntarios lavaron sus manos con agua y jabón y posteriormente se usó etanol al 70% para tener una mejor descontaminación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de un agente neutralizante en la recuperación bacteriana por el método de hisopado

La recuperación de las bacterias presentes en superficies vivas puede verse influenciada por el uso de agentes tópicos como cremas o jabones o cloro [9]. La adición de compuestos neutralizantes en la soluciones para recuperar las bacterias de la microbiota transitoria puede mejorar su recuperación. Se evaluaron dos neutralizantes, tritón X-100 y tiosulfato de sodio al 0.1% para recuperar las bacterias por el método de hisopado. Como se observa en la Imagen 1, la recuperación de bacterias con y sin neutralizantes a las concentraciones probadas, no resultó en diferencias significativas ($P < 0.05$). Por lo anterior no se utilizó agente neutralizante en los ensayos posteriores.

Recuperación de microbiota normal

Para evaluar la eficacia de la metodología de hisopado, se comparó con el método de referencia por enjuague. La técnica de enjuague mostró mejor desempeño en cuanto a la cuenta bacteriana total y la recuperación de estafilococos, como se observa en la Tabla 1. Con la técnica de enjuague no se recuperaron Enterobacterias, a diferencia de la técnica de hisopado. Lo anterior se puede atribuir a una baja carga bacteriana de la mano y a la dilución de las bacterias que se lleva a cabo en el método del enjuague (25 ml), ya que presenta un límite de detección de 250 UFC/mano, y en estas condiciones el método de hisopado permite una mejor recuperación dado que no se diluye tanto la muestra a estudiar.

Recuperación de *Escherichia coli*

Para evaluar el desempeño de las metodologías en la recuperación de un microorganismo se empleó una carga bacteriana conocida de *Escherichia coli* en las palmas de las manos de los voluntarios. Se consideró la recuperación tanto de la microbiota normal como la del microorganismo empleado para la contaminación. Se observó una variación en la recuperación estimada (1×10^8 UFC/mano) para la carga bacteriana de *E. coli* en los sujetos con ambas metodologías. Múltiples factores afectan la recuperación al momento de la contaminación como la humedad, la suciedad excesiva en la mano, el lavado de manos previo con jabones antibacteriales [9]. Por lo anterior se evaluó la contribución del lavado de manos con jabón antibacterial en la recuperación de una carga bacteriana fija de *E. coli* por contaminación; se realizó un lavado de manos previo a la contaminación así como el empleo de un agente neutralizante. Se observó que el lavado de manos es un factor que influye en la recuperación bacteriana es decir está podría ofrecer una protección a la superficie palmar después de una contaminación como se aprecia en la Tabla 3.

CONCLUSIONES

La metodología de hisopado permite cuantificar con mayor exactitud cargas bacterianas bajas en superficies palmares. En comparación con el método de enjuague, que se reconoce como metodología de referencia, que demostró dar buenos resultados en superficies palmares muy contaminadas. Los agentes neutralizantes a las concentraciones evaluadas no proporcionan una mejora en la recuperación bacteriana respecto a la solución salina. El lavado de manos con jabón antibacterial afectó la recuperación de una carga bacteriana aún en presencia de un agente neutralizante, lo que sugiere la necesidad de establecer mejores condiciones que permitan la recuperación bacteriana y así poder comparar las metodologías de hisopado y enjuague.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado de la Universidad de Guanajuato a través del programa "Veranos de Investigación Científica UG 2016" por la beca otorgada para la realización de este proyecto. A Ma. De los Ángeles Rodríguez Salazar y Gregorio Murrieta Milán por la

colaboración en el proceso experimental de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Londoño, Á. L., & Murillas, M. L. (2011). Eficacia de la higiene de manos con un preparado de base alcohólica vs lavado de manos con agua y jabón. *Acta Médica Colombiana*, 36(4), 181-186.
- [2] Romero O. C., Huertas J. M., García R., Chávez R. A., Haro O. A., Vargas R. A. (2012). Higiene de manos o lavado de manos en los hospitales: ¿Qué diría Semmelweis de los avances de los últimos 150 años?; *Revista digital universitaria* vol. 13 no 9, ISSN: 1067-6079
- [3] Serjan, M. A., & Saraceni, L. (2005). Higiene de manos. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sarda* [Internet], 24(4).
- [4] Pública, S. (1990). Procedimientos para el examen microbiológico de superficies y utensilios. México, DF.
- [5] Macinga, D. R., Beausoleil, C. M., Campbell, E., Mulberry, G., Brady, A., Edmonds, S. L., & Arbogast, J. W. (2011). Quest for a realistic in vivo test method for antimicrobial hand-rub agents: introduction of a low-volume hand contamination procedure. *Appl Environ Microbiol*, 77(24), 8588-8594.
- [6] Fuls, J. L., Rodgers, N. D., Fischler, G. E., Howard, J. M., Patel, M., Weidner, P. L., & Duran, M. H. (2008). Alternative hand contamination technique to compare the activities of antimicrobial and nonantimicrobial soaps under different test conditions. *Appl Environ Microbiol*, 74(12), 3739-3744.
- [7] Salas, J. L. V., & Macías, C. L. M. (2015). Contribución de la técnica social de lavado de manos en la reducción de microorganismos transitorios de la piel. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 1(2), 167-171.
- [8] ASTM International. 2002. Standard test method for evaluation of the effectiveness of health care personnel or consumer hand wash formulations. ASTM Standard E1174. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- [9] Boyce, J. M., and D. Pittet. 2002. Guideline for hand hygiene in health-care settings. *MMWR Recomm. Rep.* 51:1-45.

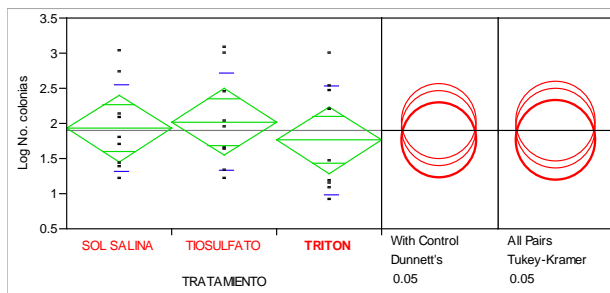


Imagen 1. Comparación del efecto de la adición de agentes neutralizantes. Se presenta la distribución de los valores de carga bacteriana obtenidos en con y sin neutralizante.

Tabla 1: Eficacia de los métodos de enjuague e hisopado en la recuperación de microbiota normal de mano

Sujetos	Microorganismos totales*		Estafilococos**		Enterobacterias***	
	E	H	E	H	E	H
	1.	5,92	3,86	5,45	3,35	0,00
2.	3,70	2,48	0,00	2,26	0,00	1,30
3.	4,54	3,68	3,70	2,90	0,00	1,60
4.	4,48	3,33	4,00	3,06	0,00	0,00
5.	4,88	3,21	4,74	3,11	0,00	1,60
Promedio	4,70	3,31	3,58	2,94	0,00	0,90
Desv. Std.	0,81	0,54	2,11	0,41	0,00	0,83

* Log 10 de la recuperación bacteriana por mano en agar nutritivo

** Log 10 de la recuperación bacteriana por mano en agar sal y manitol

*** Log 10 de la recuperación bacteriana por mano en agar MacConkey
E, Método de enjuague; H, Método de hisopado

Tabla 3. Evaluación de la recuperación bacteriana en el lavado

Sujeto	S/ lavado de manos				Lavado de manos previo			
	Microbiota normal		<i>E. coli</i>		Microbiota normal		<i>E. coli</i>	
	H	E	H	E	H	E	H	E
1.	4,02	5,59	4,06	4,60	3,47	4,60	2,77	4,30

* Log 10 de la recuperación bacteriana en agar nutritivo

** Log 10 de la recuperación de *E. coli* en agar MacConkey
E, Método de enjuague; H, Método de hisopado

Tabla 2. Recuperación de una carga bacteriana fija de *Escherichia coli* por el método de hisopado y enjuague

Sujetos	Hisopado		Enjuague	
	A*	D**	A*	D**
1.	3,24	2,60	4,84	0,00
2.	3,92	3,50	4,54	4,39
3.	3,48	4,45	4,6	6,25
4.	2,79	3,15	5,4	0,00
5.	3,53	3,47	5,00	0,00
Promedio	3,39	3,43	4,88	2,13
Desv. Stds	0,41	0,67	0,35	2,98

* Log 10 de la recuperación de una carga bacteriana fija por mano antes de la contaminación por *E. coli*

** Log 10 de la recuperación de una carga bacteriana fija en agar MacConkey posterior a la contaminación por *E. coli*.