

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO



**"DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
EN SOLUCIONES PARENTERALES Y DEMOSTRACION
DE LA PRESENCIA DE ENDOTOXINAS"**



T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. F. B. Patricia Amanda Quevedo Garza



MONTERREY, N. L.

OCTUBRE DE 1987

TM

Z66

FM

198

Q4



1020091569

104

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POST-GRADO



**"DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO
EN SOLUCIONES PARENTERALES Y DEMOSTRACION
DE LA PRESENCIA DE ENDOTOXINAS"**



T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. F. B. Patricia Amanda Quevedo Garza



MONTERREY, N. L.



OCTUBRE DE 1987

TM

Z6658

FM

1987

Q4



153207

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO
EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
U.A.N.L.

BAJO LA DIRECCION DE:

QCB. IRMA A. SALINAS
Y
DR. MANUEL A. RODRIGUEZ.

INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	13
DISCUSION Y CONCLUSIONES	35
RESUMEN	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

INTRODUCCION

Debido a que en muchos casos de contaminación de soluciones parenterales no hay una turbidez visible, éste tema surgió como respuesta a los accidentes en instituciones hospitalarias en los cuales, las soluciones parenterales que se contaminan con microorganismos durante el almacenaje de grandes volúmenes de éstos fluidos, los cuales al ser administrados a pacientes, determinaron graves situaciones clínicas y en algunos casos la muerte del paciente.

Cuando se examinó este tema a raíz de una serie de accidentes medicos reales, se encontró que no había antecedentes sobre la capacidad de éstas soluciones para servir como medio de cultivo para microorganismos en el medio ambiente de los hospitales, tanto en la literatura nacional como del extranjero disponible a nuestro alcance. Esta falta de información apremió la necesidad de conocer la dinámica del crecimiento microbiano en soluciones parenterales para conocer sus riesgos.

Los objetivos que se intentan lograr en ésta Tesis, es de conocer la capacidad nutricional de diversas soluciones parenterales de uso rutinario en hospitales, para varios microorganismos que han demostrado ser contaminantes comunes tanto del medio ambiente hospitalario como de éstas soluciones. Asi mismo, demostrar que en el caso de contaminación con bacterias gramnegativas se encuentra la cantidad suficiente de endotoxina capaz de producir un fenómeno de Shwartzman en un modelo experimental

Si bien es cierto que lo expresado anteriormente son los objetivos centrales de éste trabajo, se planteó la siguiente hipótesis:

Las soluciones parenterales de uso rutinario son medios nutritivos excelentes para los microorganismos, las cuales al sufrir una contaminación - pueden alcanzar concentraciones de microorganismos peligrosas y no dar turbidez visible, lo cual al tratarse de bacterias gramnegativas que son - capaces de producir endotoxinas, pueden producir un shock endotóxico de graves consecuencias si - son administradas a pacientes.

ANTECEDENTES

La administración de líquidos parenterales por vía intravenosa ha llegado a ser de amplio uso durante los últimos setenta años.

Hasta 1925, la solución parenteral usada con mas frecuencia fué la Solución Salina normal. Después de 1925 se usó extensamente la dextrosa para lograr soluciones isotónicas, que además son una fuente de calorías (1).

Al comienzo de la década de los años 1930, la administración de una inyección intravenosa era una técnica importante, reservada para los pacientes gravemente afectados. El médico realizaba la punción de la vena asistido por la enfermera. El éxito de la terapéutica intravenosa y el gran aumento de su uso, condujeron al establecimiento de un departamento de personal específicamente entrenado para la terapéutica con perfusiones. En 1940, el Massachusetts General Hospital fué uno de los primeros hospitales que dedicó una enfermera en exclusiva de terapéutica intravenosa (2). Los servicios de la enfermera en cuestión consistía en la administración de soluciones intravenosas y transfusiones, en el lavado de los equipos de perfusión, y en la limpieza y afilado de las agujas. Se le dió una importancia especial a la responsabilidad técnica de mantener la perfusión, y de lograr que las agujas fuesen permeables. El único requisito que se le exigía a la enfermera dedicada a la terapéutica intravenosa, es que tuviese la suficiente habilidad para realizar correctamen

te una punción venosa.

Las mejoras y las innovaciones en el equipo han reducido los riesgos; se dispone actualmente de equipos y agujas desechables, que reducen el riesgo de reacciones por pirógenos y de hepatitis. Antes de la Segunda Guerra Mundial, se usaron extensamente las agujas de metal para perfundir los líquidos parenterales. Las infiltraciones frecuentes, así como las dificultades que se producen con -- las agujas metálicas, condujeron al desarrollo en 1945 de los tubos flexibles de plástico conocidos como catéteres intravenosos (3). Estos tubos se introducían en la circulación por medio de una aguja o disecando la vena. En -- 1952, Aubaniac (4) describió por primera vez el enfoque -- percutáneo de la vena subclavia. En 1958 se introdujo el "intracath". Este tipo de catéter ha reducido la necesi-- dad de disecciones venosas, que no dejan de ser procedi-- mientos quirúrgicos.

Pese a todos los avances de la tecnología científica y médica, las complicaciones han aumentado en proporcio-- nes alarmantes. Nuestros conocimientos deben incluir ac-- tualmente la contaminación bacteriana, fúngica y de mate-- ria particulada. Hoy en día se dispone de filtros que eli-- minan el acceso de las partículas, de las bacterias y de los hongos al torrente circulatorio. El manejo y el uso a -- decuado de éste equipo, son vitales para la seguridad del paciente.

Los recipientes de cristal para líquidos estuvieron disponibles por vez primera en 1929. Posteriormente se -- han lanzado al mercado recipientes de plástico, para el -- almacenamiento tanto de soluciones parenterales como de -- productos sanguíneos.

Básicamente hay tres tipos de sistemas de perfusión: la bolsa de plástico, el sistema abierto y el sistema cerrado.

La bolsa de plástico es un recipiente popular para los líquidos parenterales; se transporta fácilmente con un riesgo mínimo y se maneja con gran facilidad. Puesto que no tiene tubos de goma, se elimina el desgarramiento y se reducen las partículas materiales. No se necesita la insuflación de aire por lo que se reduce el embolismo gaseoso y la contaminación por gérmenes del aire. Los recipientes de plástico pueden ser pinchados accidentalmente, lo cual crea una puerta de entrada para los microorganismos. Puesto que las perforaciones pueden no ser evidentes, el recipiente debe ser exprimido antes de su uso. La bolsa Viaflex está sellada con una envoltura externa de polietileno, para proteger a la bolsa y a su contenido.

Las botellas de cristal cuentan con un vacío parcial que hacen necesario las tomas de aire. Los sistemas Cutter y Abbott son sistemas cerrados puesto que solamente se permite la penetración de aire filtrado al recipiente; la toma de aire que contiene el filtro, es una parte integral del equipo de administración. El sistema abierto se usa en los equipos Mc. Gaw y Baxter; el aire entra a través de un tubo de plástico al interior del recipiente, recogiendo en el espacio aéreo de la botella.

La literatura está repleta de advertencias concernientes a los líquidos intravenosos y a los equipos de administración como vehículos potenciales de la transmisión

de infecciones en los hospitales. Varios casos de septicemia y fungemia han sido atribuidos directamente a contaminación de los aparatos intravenosos en uso, y de las soluciones (5,6). En 1969, se estudiaron treinta y tres pacientes con septicemia fúngica por un período de 18 meses en el Hospital de la Universidad de Minnesota. Esta complicación fué la causa primaria de muerte en trece pacientes. Se encontró una correlación con una cateterización intravenosa prolongada (6).

Desde 1970 a 1971, se produjeron 150 casos de bacteremia asociada con tratamiento intravenoso, en ocho hospitales de los Estados Unidos de Norteamérica. Estos casos presentaron el común denominador de haber usado en todos ellos soluciones intravenosas de un fabricante principal (7,8); se encontraron bacterias gramnegativas contaminando el equipo estéril. De resultados de ello, el Center for Disease Control (CDC) realizó un estudio de todos los sistemas intravenosos comerciales que se usaban en los hospitales. El estudio demostró el predominio mínimo del 6% de contaminación dentro de los tubos y botellas, después de haber usado el equipo de infusión. Se vió que existían determinadas condiciones que podían contribuir a la contaminación: las características del propio aparato y las manipulaciones de los equipos y de las soluciones por el personal del hospital. Se vió que dicho personal carecía de una comprensión real de la asepsia y que, por lo tanto, no realizaba una técnica aséptica.

MATERIAL Y. METODO

Se utilizaron las siguientes soluciones parentera--les: Solución de Hartmann, Solución Salina al 0.85%, Solución Dextrosa al 5% y Solución Manitol al 20%.

Se emplearon los siguientes microorganismos: Enterobacter aerogenes, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans y Bacillus subtilis.

Cada una de las soluciones parenterales, fué trabajada por triplicado con cada uno de los microorganismos ya mencionados, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de solución parenteral, desde de las cero horas y cada 24 horas hasta completar siete días.

Al mismo tiempo se tomaron dos alícuotas más, una de las cuales sirvió para demostrar la presencia de turbidéz en los frascos, la cual fué cuantificada en un espectrofotómetro Beckman.

La otra alícuota se empleó, en el caso de las bacterias gramnegativas Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa, para demostrar la presencia de endotoxinas, por el fenómeno de Shwartzman localizado en conejos.

I.- PRUEBAS DE ESTERILIDAD

Antes de ser inoculados los frascos de soluciones parenterales, se les practicó una prueba de esterilidad con

sistente en tomar un mililitro de cada frasco asépticamente, y ponerlo en placas de petri estériles, para posteriormente emplear la técnica de vaciado en placa con agar de Soya y Tripticasa fundido.

II.- PREPARACION DE LOS INOCULOS

Para la elaboración del inóculo se prepararon matraces de 125 ml. conteniendo cada uno 50 ml. de caldo de Soya y Tripticasa. Cada matrás se inoculó con una asada de cada bacteria, proveniente de un cepario de la colección del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y fueron incubados estáticamente a 37°C. durante 18 horas. Para Candida albicans se utilizó caldo de Sabouraud y se incubó estáticamente a 37°C. por 18 horas. Pasado este tiempo se hicieron diluciones a partir de cada matrás en tubos conteniendo 9 ml. de agua destilada estéril, hasta tener una dilución tal que 1 ml. de ésta dilución - al ser inoculada en los frascos de solución parenteral, - dé una concentración de 10 unidades formadoras de colonia por mililitro.

Fué necesario hacer las siguientes correcciones a los inóculos: para la Solución Manitol al 20% el inóculo fué ajustado a 10^4 unidades formadoras de colonias por mililitro para todos los microorganismos, debido a que no fué posible observar desarrollo y obtener cantidades estadísticamente aceptables. Por ésta misma razón el inóculo de Bacillus subtilis en Solución Salina al 0.85% y Dextrosa al 5% fué modificado a 10^3 unidades formadoras de colonias por mililitro.

III.- CUANTIFICACION DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Ya inoculados los frascos de solución parenteral, -- fueron tomadas tres muestras; una fué utilizada para el recuento de las unidades formadoras de colonias, otra se utilizó para el estudio de turbidimetría, y la tercera -- fué utilizada para la demostración de endotoxinas.

Tomadas las muestras correspondientes a las 0 horas, se almacenaron los frascos de solución parenteral a temperatura ambiente, para simular las condiciones de almacenaje. La muestra correspondiente al estudio turbidimétrico fué procesada inmediatamente, mientras que otra de las -- muestras fué guardada en refrigeración, para posteriormente demostrar la presencia de endotoxinas.

El recuento de las unidades formadoras de colonias a las 0 horas se realizó tomando 1 ml. directamente del --- frasco recién contaminado artificialmente y depositándolo en una placa de petri y añadiendo 20 ml. de agar Soya y - Tripticasa fundido a 40°C. para contar directamente las unidades formadoras de colonias iniciales.

El recuento de las unidades formadoras de colonias a las 24 horas de ser inoculados los frascos se realizó mediante la técnica de dilución y vaciado en placa. Se tomó 1 ml. de cada frasco contaminado artificialmente, se hicieron las diluciones necesarias en tubos conteniendo 9ml. de agua destilada estéril, calculando la dilución que contuviera la dilución estadísticamente adecuada (30 a 300 U

FC/ml.). De éstas diluciones se tomó 1 ml. que se depositó en cajas de petri estériles a los cuales se les vació 20 ml. de agar de Soya y Tripticasa fundido, las cuales - después de ser agitadas se guardaron en incubación a 37°C por 24 horas. Después de ser incubadas fueron cuantificadas las colonias de las placas que tuvieran de 30 a 300 unidades formadoras de colonias por mililitro, ya fuera directamente o con la ayuda de un aparato cuentacolonias. Este procedimiento se repitió cada 24 horas hasta completar 168 horas (7 días).

IV.- DEMOSTRACION DE TURBIDEZ

Para la demostración de la turbidez en los frascos -- contaminados artificialmente, se tomaron alícuotas desde el momento de la inoculación, o sea desde las 0 horas, y cada 24 horas hasta 168 horas. Estas muestras fueron leídas directamente en un espectrofotómetro Beckman a 530 nm. de longitud de onda.

V.- DEMOSTRACION DE ENDOTOXINAS

Para demostrar la presencia de endotoxinas en los -- frascos contaminados artificialmente con bacterias gramnegativas como lo fueron Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa, se procedió primeramente a la extracción de las endotoxinas de las cepas patrón, mediante la técnica que a continuación se describe:

Del cultivo stock de Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa, se inocularon dos tubos de 16x150 mm. -

conteniendo 5 ml. de caldo de Soya y Tripticasa, incubándose 4 horas a 37°C. Se inoculó con éste caldo un matrás Erlen Meyer de 250 ml. conteniendo 60 ml. de caldo de Soya y Tripticasa, incubándose a 37°C. con agitación durante 4 horas. De éste cultivo se inocularon 6 matraces de 2 litros conteniendo 200 ml. de caldo de Soya y Tripticasa. - Se incubaron por 18 horas con agitación a 37°C. Este cultivo fué centrifugado y lavado con Solución Salina dos veces con centrifugación a 4000 x g durante 15 minutos y se cado.

Se suspendieron aproximadamente 3 gramos de los microorganismos secos en 350 ml. de agua a 65-68°C., se agregaron 350 ml. de fenol al 90% a 65-68°C. Se agitó la mezcla por 20 minutos a la misma temperatura. Se enfrió después de éste tiempo a 5-10°C. y se centrifugó. La fase acuosa fué decantada y la fase fenólica fué tratada otra vez con 300 ml. de agua a 68°C. y después fué enfriada. - Se separó la segunda fase acuosa. Las dos fases acuosas fueron dializadas contra agua destilada por 48 horas con tres cambios de agua. las fases acuosas ya dializadas fu ron concentradas a 10 a 15 ml. y posteriormente todo fué centrifugado para remover insolubles. La endotoxina fué precipitada con 10 volúmenes de etanol en presencia de una pequeña cantidad de acetato de sodio. El precipitado fué lavado con etanol y acetona y posteriormente fué di suelto en agua y liofilizado.

Para demostrar la presencia de endotoxinas en los frascos de solución parenteral contaminadas artificialmente con bacterias gramnegativas, se procedió a in yectar intradermicamente en el lomo de conejos blancos rasurados,

0.1 ml. de los sueros, que tenían siete días de incubación a temperatura ambiente, y pasadas 24 horas, se procedió a inyectar por vía intravenosa en la vena marginal -- del conejo 0.5 ml. del extracto de la endotoxina para desencadenar el fenómeno de Shwartzman.

Se tuvieron que hacer correcciones para la obtención del fenómeno de Shwartzman: todas las soluciones que se estudiaron tuvieron que ser concentradas diez veces por evaporación a baño de agua y de ahí se tomó 0.1 ml. para ser inyectados en el lomo de los conejos intradermicamente.

RESULTADOS

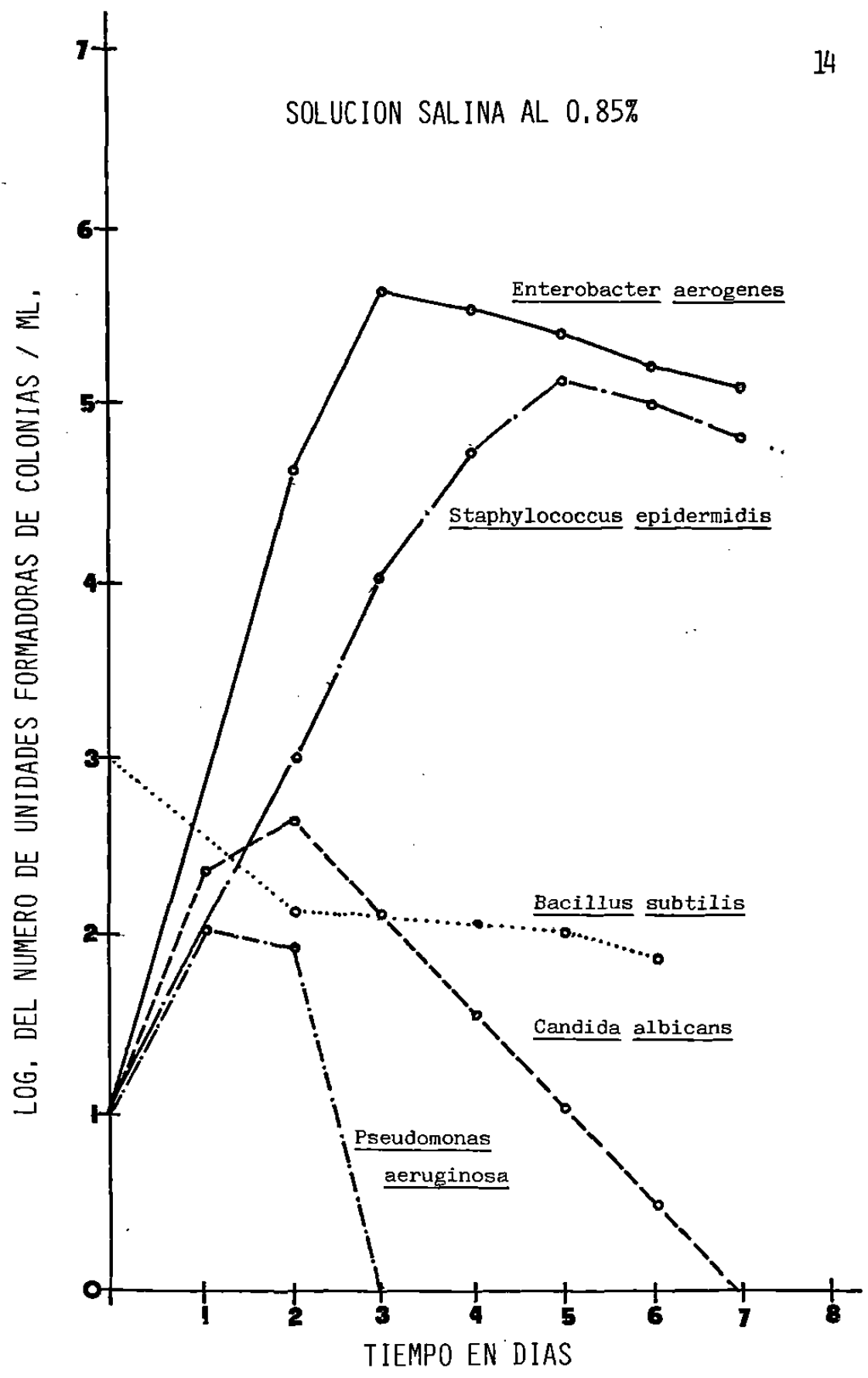
I.- CUANTIFICACION DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

El resultado que se obtuvo en los estudios con Solución Salina al 0.85% se expresa en la gráfica número uno, donde se observa un gran desarrollo de Enterobacter aerogenes y de Staphylococcus epidermidis del orden de 10^5 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml.) en un tiempo de 3 y 5 días respectivamente, para luego observar una lenta disminución del número de UFC/ml. al término de el séptimo día.

Contrariamente, se observa un pobre desarrollo en el caso de Candida albicans, que presenta su nivel mas alto de desarrollo al primero y segundo día con cantidades del orden de 10^2 UFC/ml., presentándose un descenso en el número de Unidades Formadoras de Colonia y desaparición total del inóculo al séptimo día.

Resultados similares se observan para Pseudomonas aeruginosa con un desarrollo del orden de 10^2 UFC/ml. en el primero y segundo día y la desaparición total del inóculo hacia el tercer día.

En el caso de Bacillus subtilis, como ya se mencionó anteriormente, el inóculo fué ajustado a 10^3 UFC/ml. porque como lo expresa la gráfica número uno, se observó un



GRAFICA # 1

marcado descenso al primer día, para mantenerse constante hasta el cuarto día, para posteriormente decrecer lentamente hasta el séptimo día.

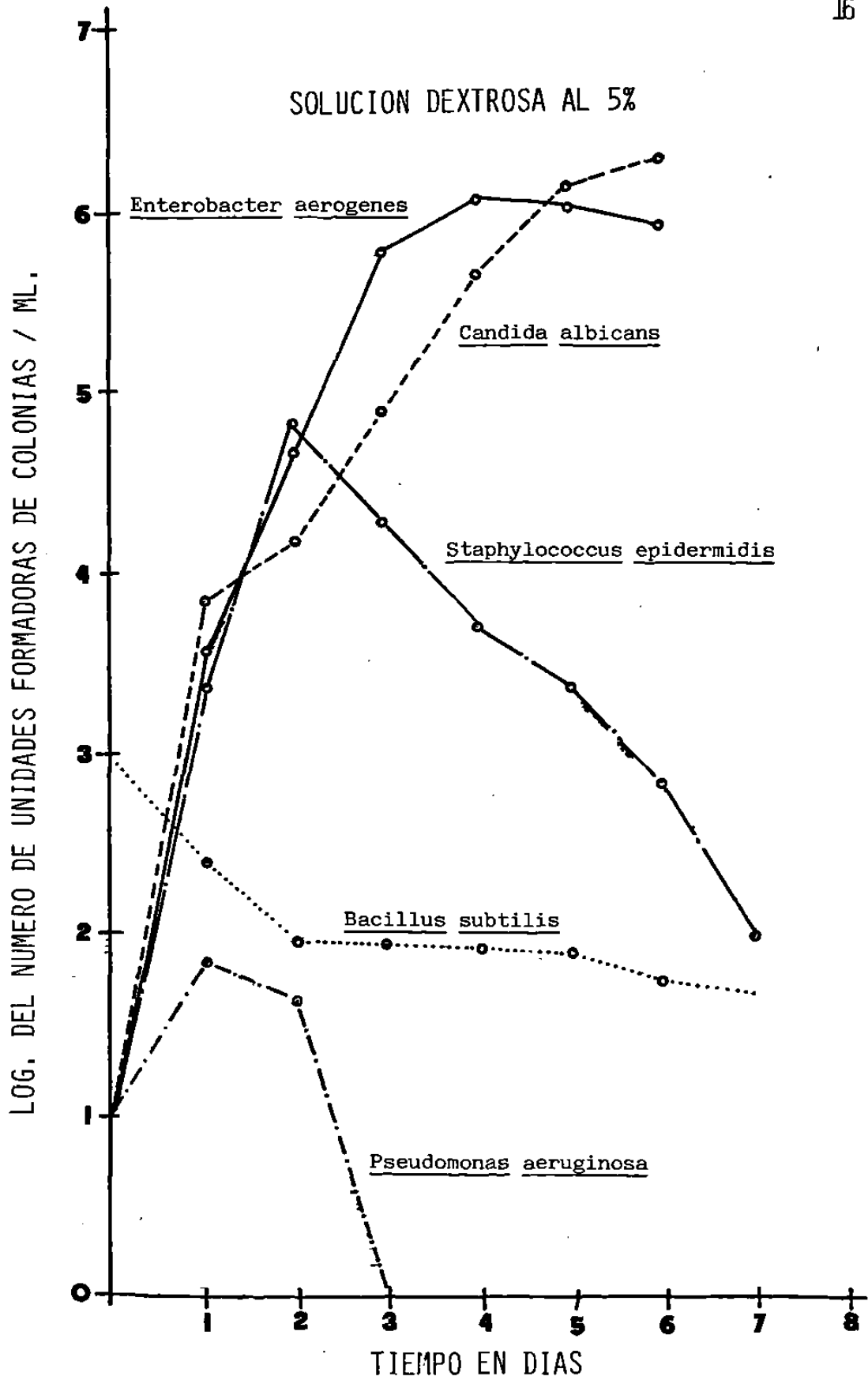
El comportamiento de los microorganismos frente a la Solución Dextrosa al 5%, se ve representado en la gráfica número dos, donde se observa el crecimiento muy similar - entre Enterobacter aerogenes y Candida albicans, mostrando el máximo desarrollo alrededor del cuarto y quinto día del orden de 10^5 UFC/ml., manteniéndose así hasta el séptimo día.

El Staphylococcus epidermidis muestra un desarrollo muy rápido, alcanzando su nivel mas alto al segundo día, con cantidades del orden de 10^4 UFC/ml.

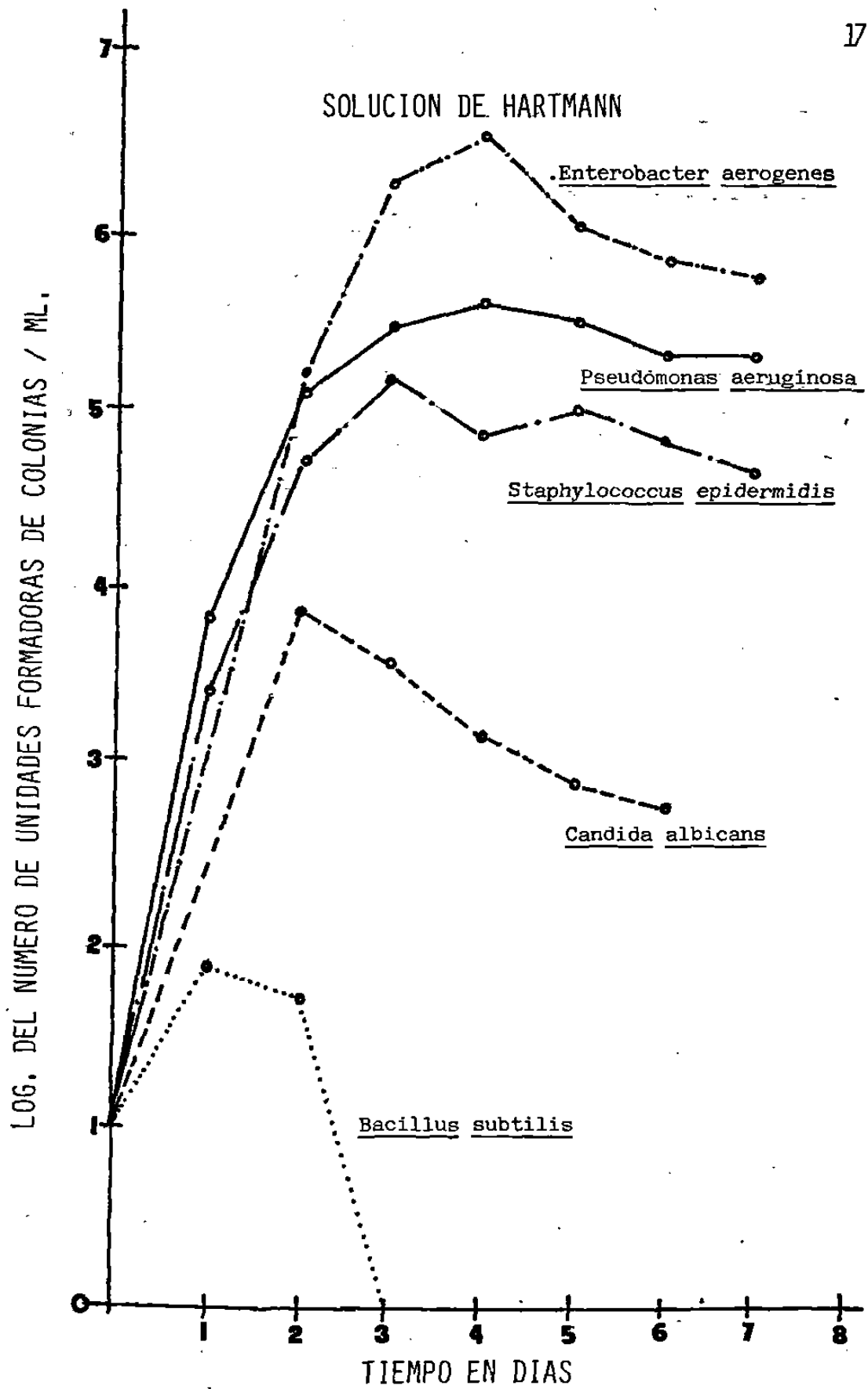
Como ya se mencionó anteriormente, el inóculo de Bacillus subtilis fué ajustado a 10^3 UFC/ml., observándose de inmediato una brusca caída en la cuenta bacteriana hasta el segundo día, donde llega a nivel de 10^2 UFC/ml. manteniéndose con un ligero descenso hasta el séptimo día.

En el caso de Pseudomonas aeruginosa observamos que experimenta un pobre desarrollo, obteniendo sus mas altos valores al primer día con cantidades de 85 UFC/ml., mostrando posteriormente una disminución del número de Unidades Formadoras de Colonias para concluir al tercer día.

En la gráfica número tres se ve representado el comportamiento de los microorganismos empleados frente a la solución de Hartmann. En ésta gráfica observamos que Pseu



GRAFICA # 2



GRAFICA # 3

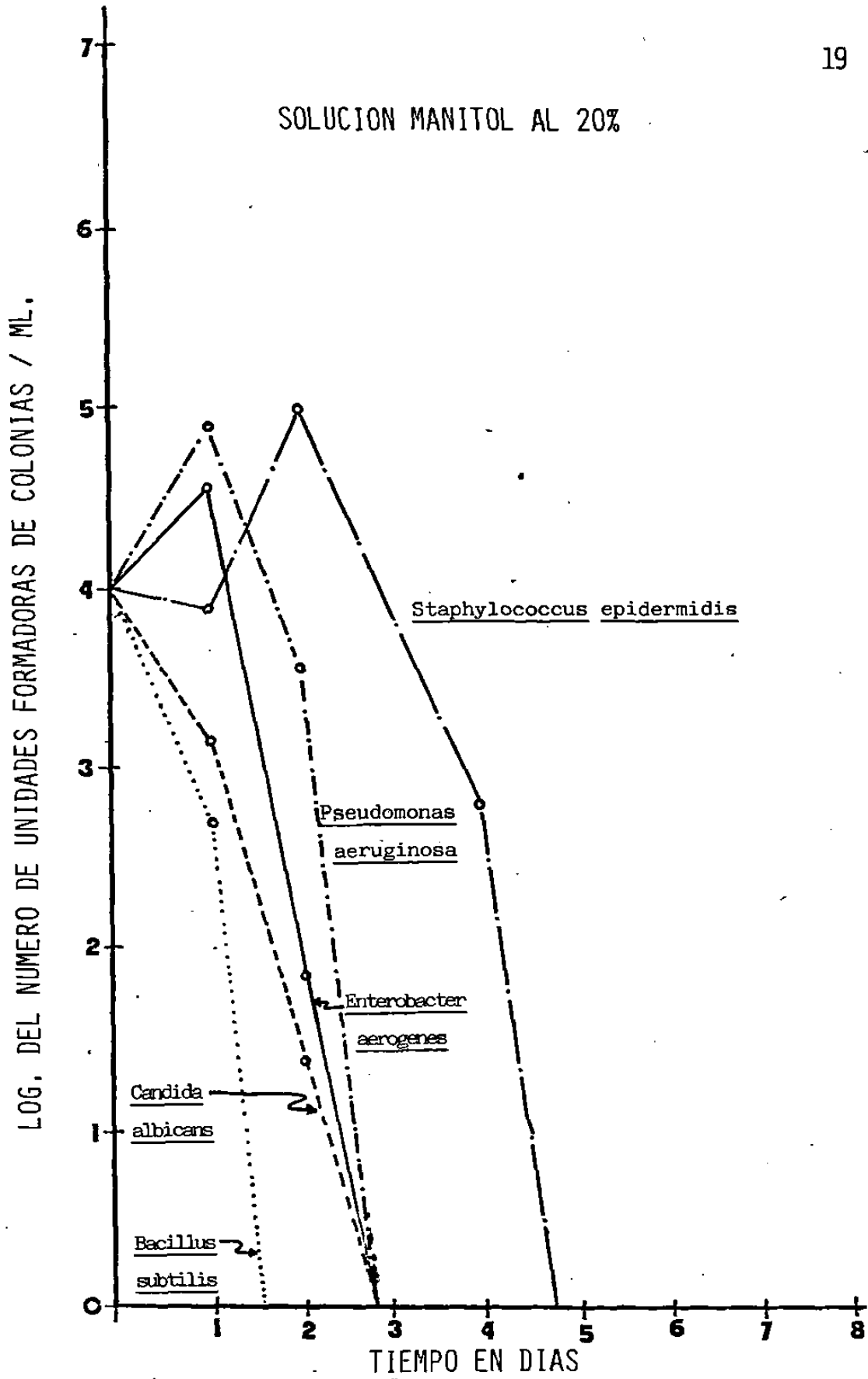
Pseudomonas aeruginosa obtiene un gran desarrollo del orden de 10^6 UFC/ml. al cuarto día, observándose un comportamiento similar para Enterobacter aerogenes y Staphylococcus epidermidis, con recuentos de 10^5 UFC/ml. alrededor del tercero y cuarto días.

En el caso de Candida albicans observamos el máximo desarrollo hacia el segundo día, donde alcanza niveles de casi 10^4 UFC/ml. para posteriormente decrecer hasta el séptimo día.

Aquí observamos que Bacillus subtilis muestra un escaso desarrollo, alcanzando su recuento más alto al primer día con cantidades de 85 UFC/ml. para luego desaparecer completamente al tercer día.

En la gráfica número cuatro se observa el comportamiento de los microorganismos estudiados frente a la Solución Manitol al 20%, donde se muestra un desarrollo similar entre todos los microorganismos. Debemos recordar que el inóculo inicial para todos los microorganismos frente a ésta solución parenteral, tuvo que ser ajustado a 10^4 UFC/ml.

En la gráfica se observa un comportamiento similar entre todos los microorganismos. Mientras que Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa registran un pequeño desarrollo al primer día con cantidades de 4×10^4 y 7.5×10^4 UFC/ml. respectivamente, o sea niveles no muy por encima del inóculo inicial, Staphylococcus epidermidis también logra un desarrollo similar pero al tercer día, para



GRAFICA # 4

TABLA # 1

SOLUCION PARENTERAL	MICROORGANISMO	UFC/ml	DIA
SOLUCION SALINA AL 0.85%	<u>Enterobacter aerogenes</u>	4×10^5	3
Cada 100 ml. contienen:	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	1×10^5	5
Cloruro de sodio...0.85 g.	<u>Candida albicans</u>	4×10^2	2
Agua inyectable.....c.b.	<u>Bacillus subtilis</u>	2×10^2	1
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	1×10^2	1
SOLUCION DEXTROSA AL 5%	<u>Enterobacter aerogenes</u>	4×10^5	4
Cada 100 ml. contienen:	<u>Candida albicans</u>	4×10^5	7
Dextrosa.....5 g.	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	2×10^4	2
Agua inyectable.....c.b.	<u>Bacillus subtilis</u>	1×10^2	2
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	8×10^1	1
SOLUCION DE HARTMANN	<u>Enterobacter aerogenes</u>	4×10^6	4
Cada 100 ml. contienen:	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	6×10^5	4
Cloruro de sodio.....0.60g.	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	2×10^5	3
Cloruro de potasio...0.03g.	<u>Candida albicans</u>	9×10^3	2
Cloruro de calcio....0.02g.	<u>Bacillus subtilis</u>	9×10^1	1
Lacteto de sodio.....0.31g.			
Agua inyectable.....c.b.			
SOLUCION MANITOL AL 20%	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	8×10^4	1
Cada 100 ml. contienen:	<u>Staphylococcus epidermidis</u>	8×10^4	2
Manitol.....20 g.	<u>Enterobacter aerogenes</u>	4×10^4	1
Agua inyectable.....c.b.	<u>Bacillus subtilis</u>	1×10^4	0
	<u>Candida albicans</u>	1×10^4	0

posteriormente experimentar un brusco descenso y desaparición de la cuenta bacteriana para estas tres bacterias entre el tercero y quinto día del experimento.

Contrariamente, Candida albicans y Bacillus subtilis no registran ningún desarrollo, cayendo su recuento celular desde el primer día, obteniéndose sus niveles mas bajos hacia el segundo y quinto día respectivamente.

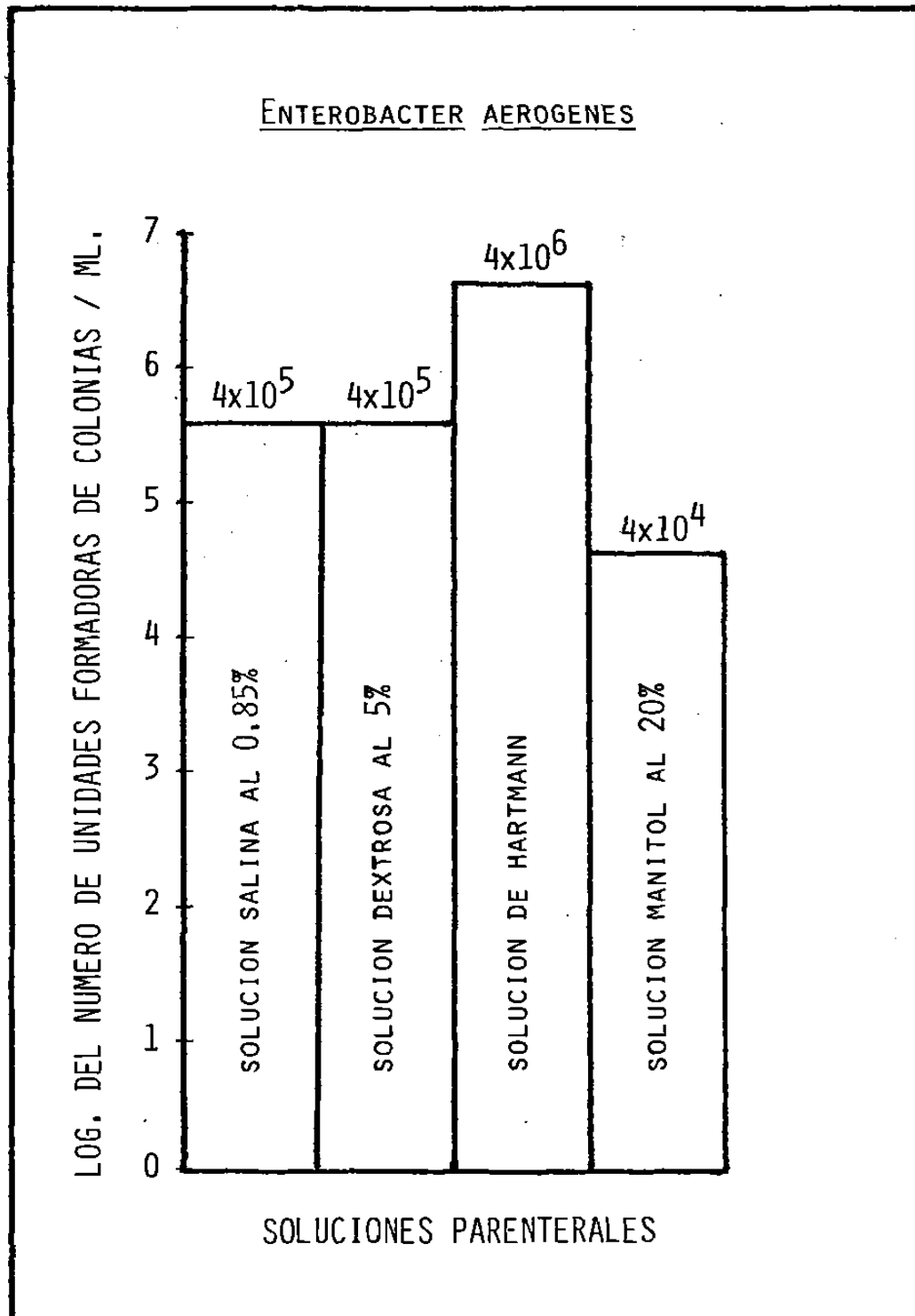
La tabla número uno representa la composición química de cada solución parenteral, y hace una relación comparativa en orden decreciente con los máximos valores de unidades formadoras de colonias por mililitro alcanzados por los microorganismos.

Se observa que Enterobacter aerogenes es el que tiene mayor desarrollo en Solución Salina al 0.85% junto con Staphylococcus epidermidis con valores semejantes del orden de 10^5 UFC/ml., seguidos por Candida albicans, Bacillus subtilis y Pseudomonas aeruginosa, éstos últimos con valores de 10^2 UFC/ml.

Para Solución Dextrosa al 5% se observa el mayor desarrollo con Enterobacter aerogenes y Candida albicans, con valores del orden de 10^5 UFC/ml., seguidos por orden decreciente de Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis y Pseudomonas aeruginosa.

En el caso de Solución de Hartmann se observa el mas alto desarrollo alcanzado por Enterobacter aerogenes con cantidades de 10^6 UFC/ml., seguido por Pseudomonas aeruginosa.

GRAFICA # 5



nosa y Staphylococcus epidermidis, con desarrollo de 10^5 UFC/ml.. Para Candida albicans y Bacillus subtilis se observa poco desarrollo con cantidades de 10^3 y 10^1 UFC/ml. respectivamente.

En el caso de Solución Manitol al 20% no se observa desarrollo significativo, ya que el máximo desarrollo alcanzado por cualquiera de los microorganismos no sobrepasa el orden del inóculo que fué de 10^4 UFC/ml., observándose éste mismo comportamiento para todos los microorganismos.

La gráfica número cinco representa otro aspecto comparativo de éste trabajo. En este caso se hace una comparación de un solo microorganismo frente a todas las soluciones parenterales con el fin de relacionar qué tipo de solución o soluciones parenterales son más susceptibles a desarrollar el crecimiento de éstos microorganismos.

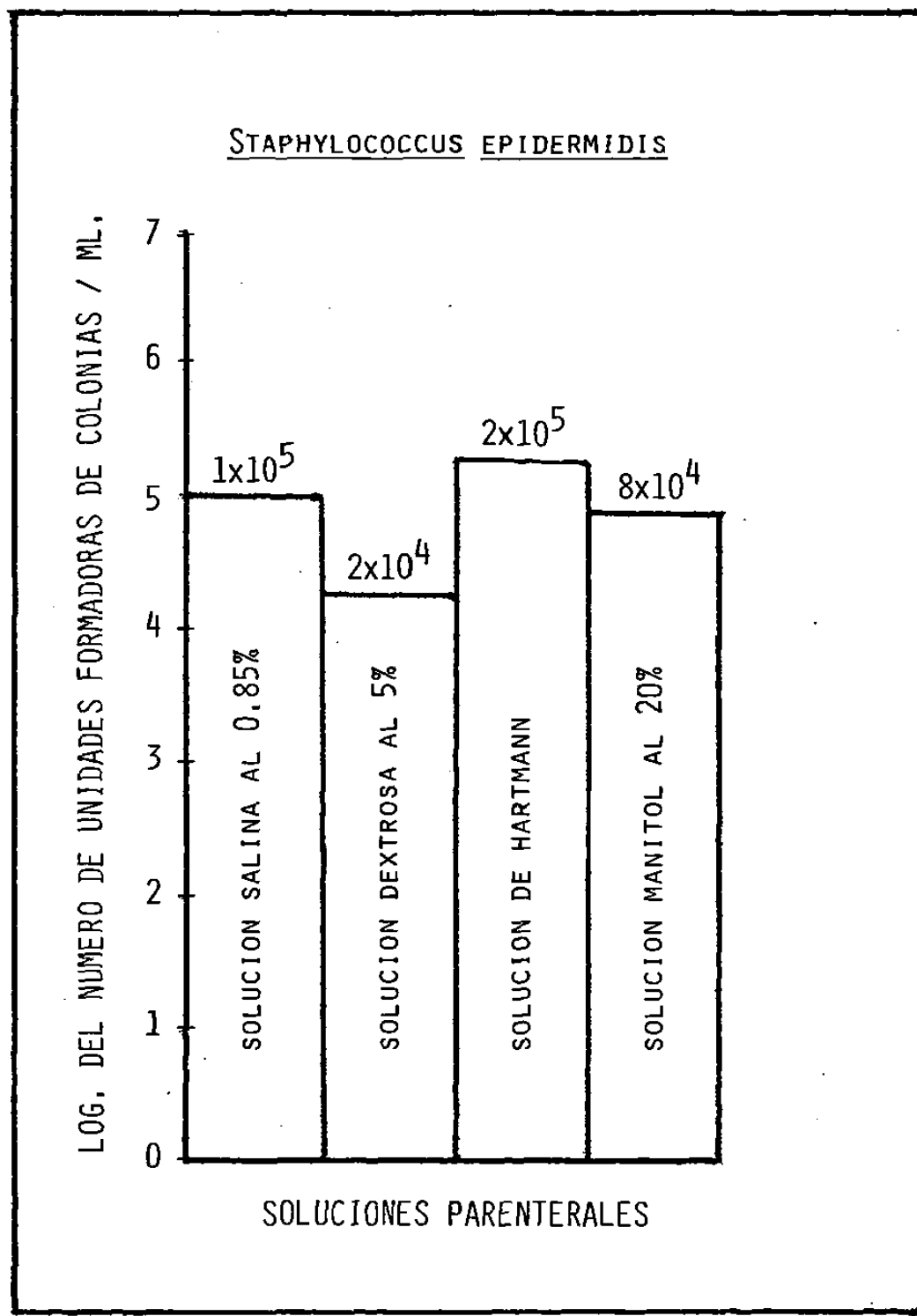
Enterobacter aerogenes

Se observa que por lo general Enterobacter aerogenes se desarrolla bien en casi todas las soluciones parenterales, tomando en cuenta que el inóculo para Solución Manitol al 20% fué de 1×10^4 UFC/ml. Aquí se muestra el máximo desarrollo con Solución de Hartmann.

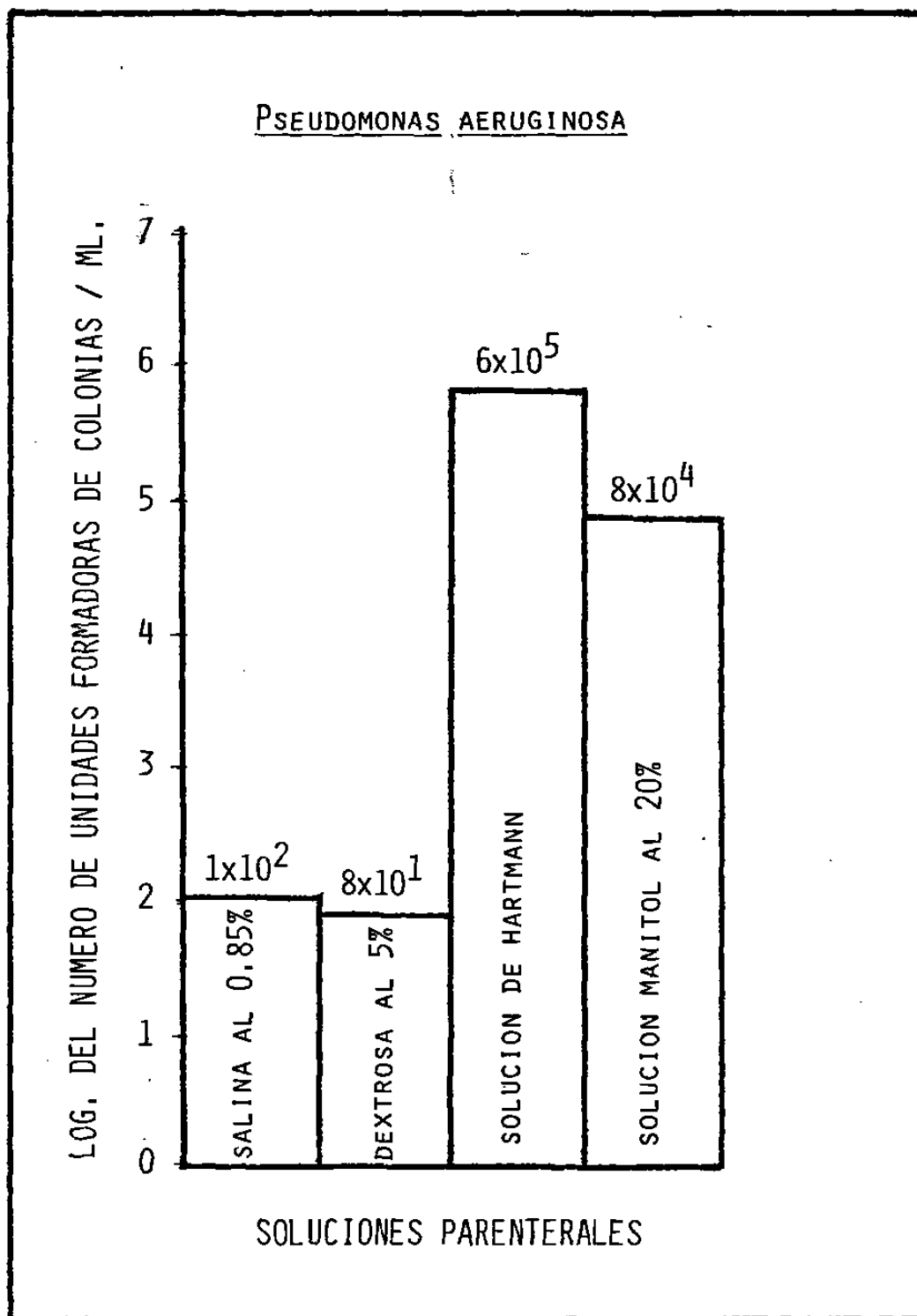
Staphylococcus epidermidis

La gráfica número seis es el caso de Staphylococcus epidermidis, donde se observa también un buen desarrollo

GRAFICA # 6



GRAFICA # 7



frente a todas las soluciones parenterales estudiadas, observándose una ligera preferencia por la Solución de Hartmann.

Pseudomonas aeruginosa

Con la gráfica número siete, vemos que Pseudomonas aeruginosa muestra poca preferencia por la Solución Salina al 0.85% y por Solución Dextrosa al 5%, en contraste con el desarrollo observado con Solución de Hartmann. Recordamos que el inóculo con Solución Manitol al 20% fué de 1×10^4 UFC/ml., para observar que se obtuvo poco desarrollo de esta solución parenteral.

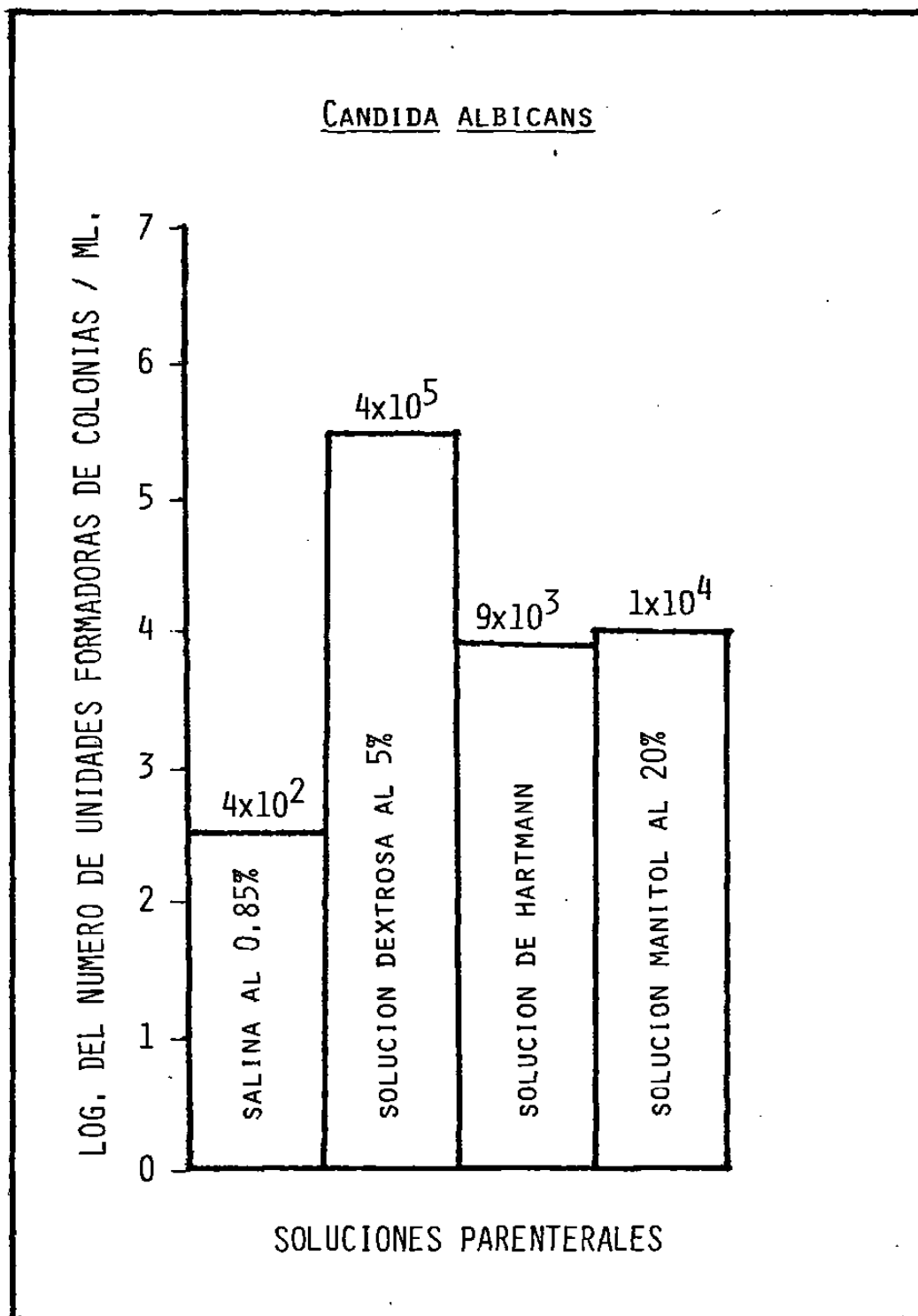
Candida albicans

El caso de Candida albicans se observa en la gráfica número ocho, donde se obtiene niveles de desarrollo moderados, claro está, tomando en consideración la corrección hecha para Solución Manitol al 20%. Solución Dextrosa al 5% muestra un buen desarrollo a ésta levadura.

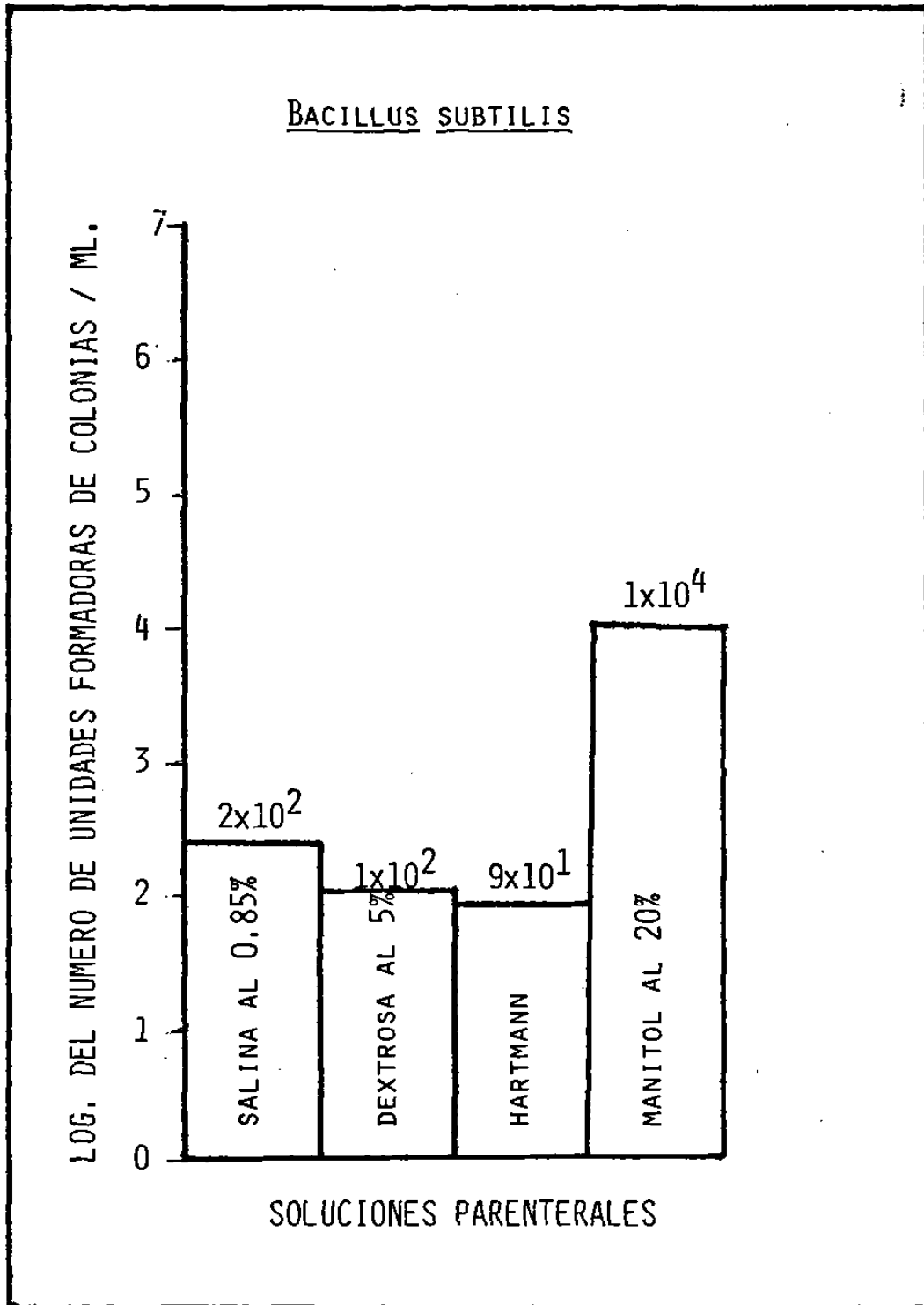
Bacillus subtilis

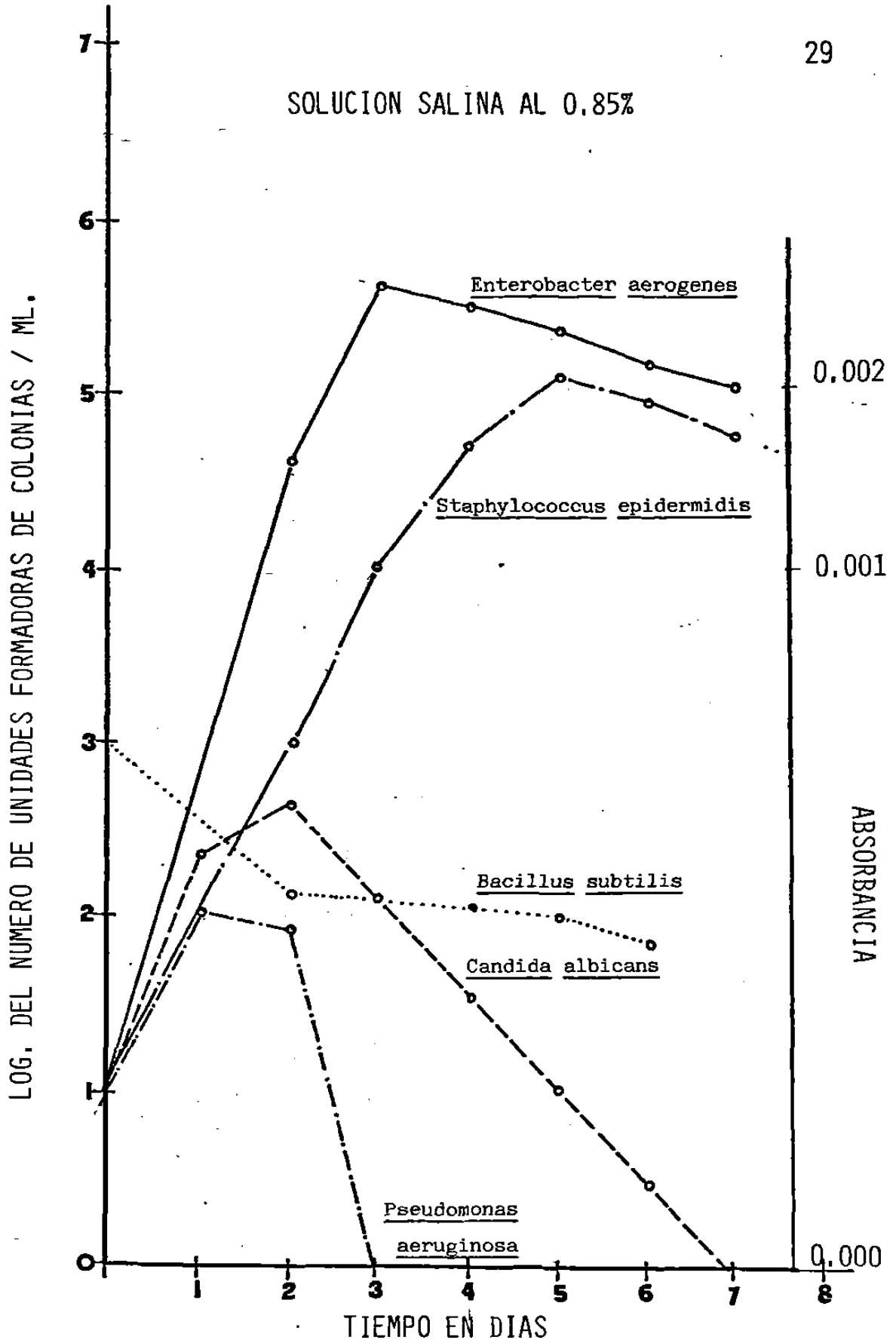
En la gráfica número nueve, correspondiente a Bacillus subtilis, se observa un pobre desarrollo frente a todas las soluciones parenterales en general, recordándose que el inóculo de Solución Manitol al 20% fué el valor aquí registrado, o sea 1×10^4 UFC/ml. observándose ningún desarrollo en este caso.

GRAFICA # 8

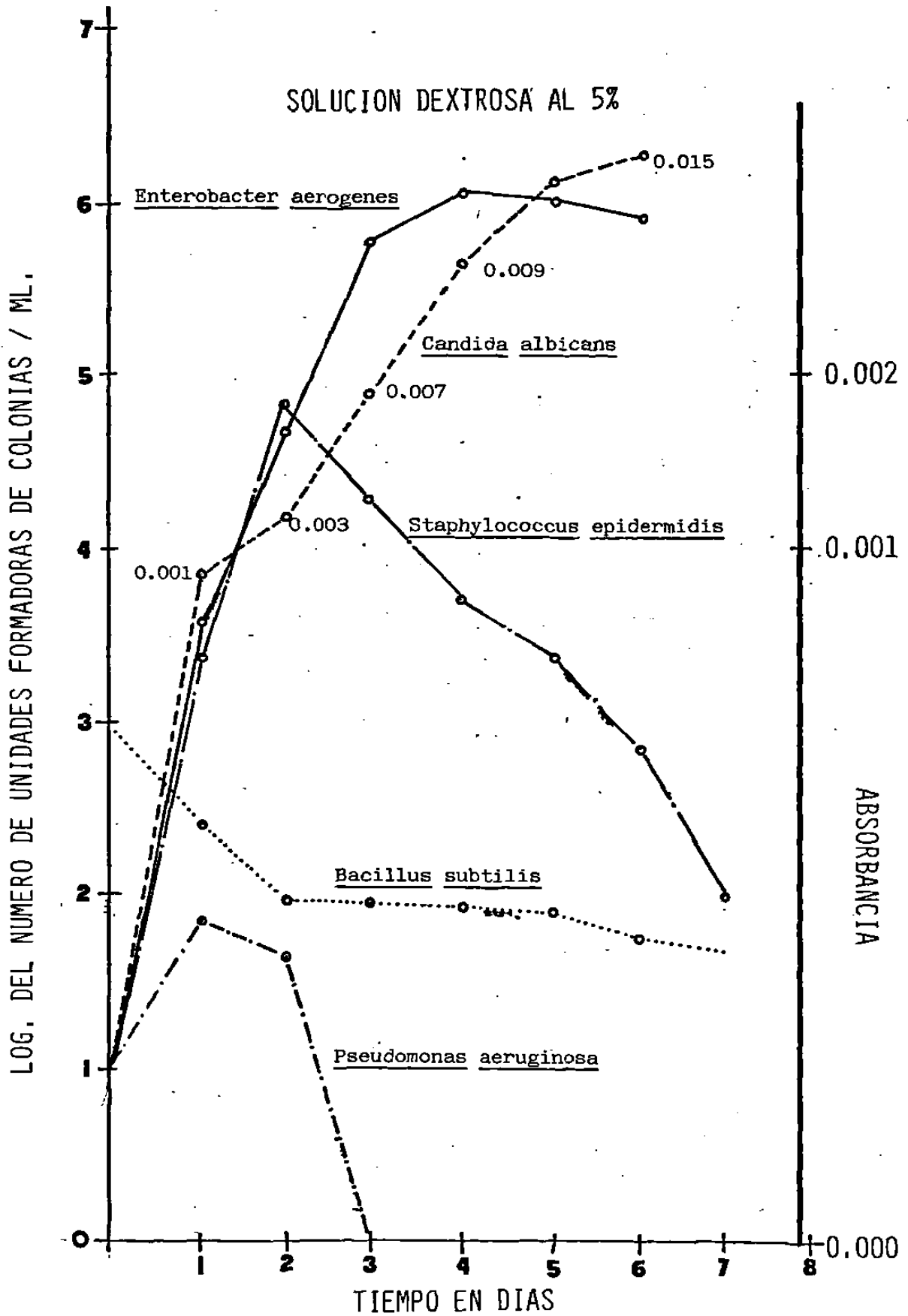


GRAFICA # 9





GRAFICA # 10



GRAFICA # 11

II.- CUANTIFICACION DE TURBIDEZ

Los resultados obtenidos del estudio espectrofotométrico de los microorganismos frente a solución salina al 0.85% se expresan en la gráfica número diez, donde se observan los valores obtenidos de absorbancia. Se observa que a una concentración de microorganismos arriba de 10^5 UFC/ml. se registran valores de absorbancia de 0.002, para concentraciones mayores de 10^4 UFC/ml. se registran valores de absorbancia de 0.001, mientras que valores por a bajo de 10^4 UFC/ml. se observan valores de absorbancia de 0.000.

En la gráfica número once, correspondiente a solución Dextrosa al 5%, se observan las lecturas de absorbancia para los microorganismos estudiados. Se observan valores de absorbancia de 0.002 para niveles de concentración arriba de 10^5 UFC/ml. Concentraciones arriba de 10^4 UFC/ml. registran valores de absorbancia de 0.001. En esta gráfica es necesario hacer la aclaración de los valores obtenidos para Candida albicans. Debido a que el tamaño de la célula de levadura es mucho mayor al de las demás bacterias estudiadas y la gran concentración de unidades formadoras de colonias por mililitro obtenida frente a esta solución parenteral, si se observó turbidez visible y espectrofotométricamente se observaron valores hasta de 0.015 de absorbancia en su máxima concentración alcanzada. Los valores para Candida se expresan sobre cada punto de la gráfica.

La gráfica número doce correspondiente a Solución de Hartmann muestra valores de absorbancia similares a los obtenidos para las otras soluciones parenterales. Se observan valores de absorbancia de 0.002 para concentraciones arriba de 10^5 UFC/ml. obteniéndose valores de 0.001 para concentraciones de 10^4 UFC/ml. y por debajo de ésta concentración, los niveles de absorbancia registrados son de 0.000.

La gráfica número trece que corresponde a Solución - Manitol al 20%, se observa que para los niveles de concentración arriba de 10^4 UFC/ml. se obtienen valores de absorbancia de 0.001 y por debajo de esta concentración se registran valores de absorbancia de 0.000.

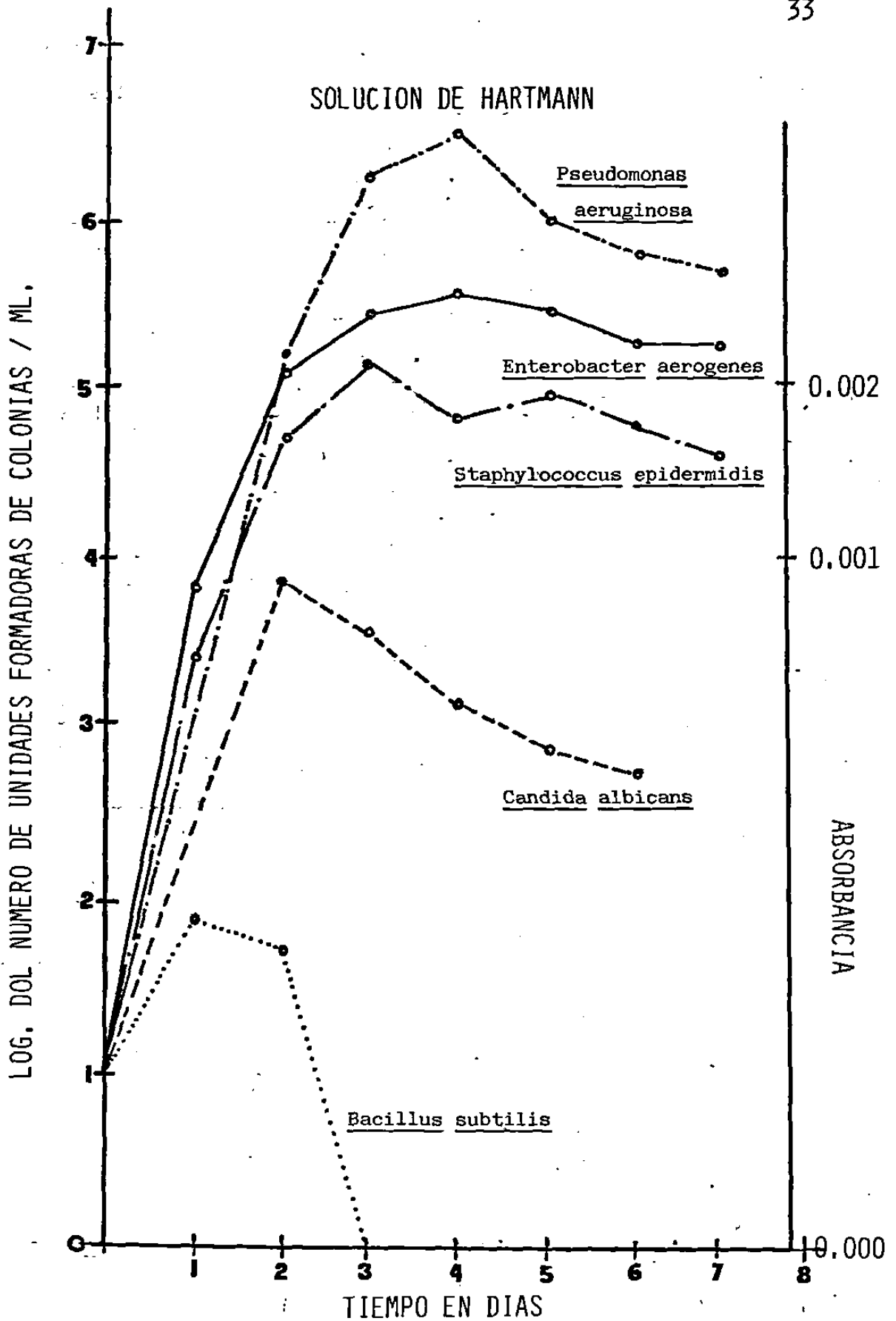
III.- DEMOSTRACION DE ENDOTOXINAS

La presencia de endotoxinas quedó demostrada al llevarse a cabo la reacción de Shwartzman en conejos, mediante la técnica anteriormente mencionada.

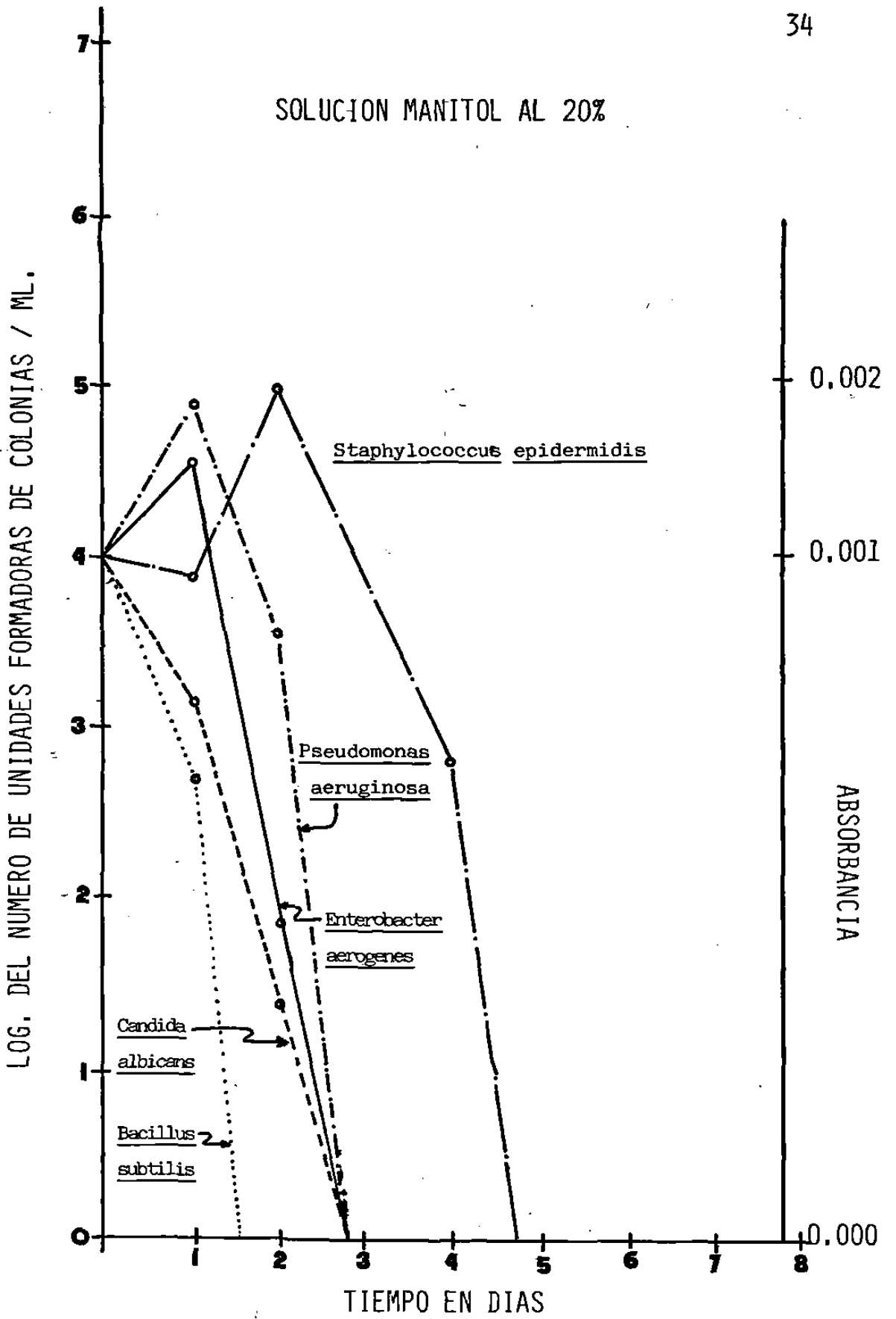
Se observó en los sitios de inoculación zonas de eritema y necrosis. Las zonas de mayor reacción observadas fueron de Enterobacter aerogenes con Solución Salina al 0.85%, Solución Dextrosa al 5% y Solución de Hartmann, -- con zonas que van de 5 a 7 mm. de diámetro del eritema; - en cambio con Solución Manitol al 20%, la reacción eritematosa fué de cuatro mm. de diámetro.

Para Pseudomonas aeruginosa se observaron zonas de eritema de 4 mm. de diámetro con Solución Salina al 0.85%, Solución Dextrosa al 5% y Solución Manitol al 20%, obser-

vándose 6 mm. de diámetro en el eritema con Solución de -
Hartmann.



GRAFICA # 12



GRAFICA # 13

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se observan en las primeras gráficas (1 a 4), los resultados referentes al desarrollo de todos los microorganismos en cada una de las soluciones parenterales, en la mayoría de ellas se demostró un buen desarrollo de los microorganismos, salvo en soluciones con solutos a alta concentración, como lo es la Solución de Manitol al 20% (gráfica # 4), donde debido a la gran presión osmótica que se ejerce sobre los microorganismos, no hay multiplicación microbiana, evidenciándose así una baja o nula capacidad de contaminación de la misma.

Otro caso es el de la Solución Salina al 0.85%, en la que a pesar de no contener nutrientes, estimula un buen desarrollo de Enterobacter aerogenes y Staphylococcus epidermidis hacia el tercer día. Esto podría explicarse porque ésta solución parenteral provee, si no nutrientes, sí un medio isotónico propicio en el que el metabolismo endógeno continúa y quizá la presencia de sustancias contaminantes del cloruro de sodio que actúan como nutrientes.

La Solución Dextrosa al 5% (gráfica # 2) al igual que la anterior, provee de un medio isotónico, además de un carbohidrato como nutriente, la glucosa, que es utilizable metabólicamente por casi todas las bacterias ensayadas. Se observó que el desarrollo se ve favorecido para Enterobacter aerogenes, Candida albicans y Staphylococcus epidermidis.

En contraste con las soluciones parenterales anteriores, donde se observa el desarrollo de unas bacterias pero de o---

tras no, la Solución de Hartmann es capaz de estimular el crecimiento de todos los microorganismos inoculados. Posiblemente esto se puede explicar porque su contenido es mas rico en sales y lactato de sodio, el cual es utilizado rápidamente en el metabolismo. Como se observa en la gráfica # 3, el desarrollo de las diversas bacterias fué bueno, aún así para Bacillus subtilis que aunque mostró poco desarrollo, debemos tomar en cuenta que partió de un inóculo igual al de los demás, no así en las otras soluciones parenterales donde el inóculo tuvo que ser mayor. El lactato, por otro lado, no es utilizado en forma igual por todos los microorganismos.

En los resultados que se obtuvieron del estudio de turbidez, se observan datos similares para todas las bacterias, o sea, que a pesar de haber alcanzado una concentración celular hasta de un millón de unidades formadoras de colonias por mililitro (1×10^6 UFC/ml.), los resultados de Absorbancia obtenidos fueron tan bajos que no representan una turbidez apreciable a simple vista.

Solamente Candida albicans en Solución Dextrosa al 5% -- (gráfica # 11) debido al gran desarrollo que presenta y a que el tamaño de la célula de levadura es considerablemente mayor que el de las bacterias, se observó una turbidez visible desde concentraciones de 1×10^6 UFC/ml.

Este dato es de grán interés, ya que soluciones aparentemente transparentes, son capaces de albergar hasta 1×10^6 bacterias por mililitro, de manera tal que la mera inspección visual por una enfermera, médico ó cualquier persona, no es una forma confiable de decir que una solución parenteral no está

contaminada. El esterilizar la solución, tampoco es una forma de resolver el problema, ya que aún las células bacterianas - muertas son capaces de causar shock endotóxico (34).

Los resultados obtenidos en este trabajo, ponen de manifiesto la necesidad de crear conciencia, tanto en el personal que interviene en la elaboración de las soluciones parenterales como del que las transporta, almacena y administra, ya -- que el riesgo de que se contaminen por mal manejo puede atraer graves consecuencias.

Antes de ser usados los recipientes deben ser examinados, preferiblemente a la luz y con un fondo obscuro, para visualizar si hay fisuras, defectos, turbidéz y partículas; los recipientes de plástico deben ser exprimidos para detectar cualquier agujero. Puede producirse una punción accidental de la bolsa sin que sea evidente, proporcionando una puerta de entrada a los microorganismos (4). Cualquier botella con una fisura o un defecto debe ser considerada sospechosa y se debe rechazar. Cualquier botella de cristal que carezca de vacío - al abrirla, no debe ser usada.

Los estudios llevados por Hansen y Hepler (35), demostraron que los líquidos intravenosos de un sistema intravenoso - de flujo abierto (sin filtro de aire) puede llegar a contaminarse con los microbios del aire cuando el recipiente al vacuo se llena con aire no estéril. Cuando se llena un recipiente de cristal de un litro, penetran aproximadamente 100 ml. - de aire para reemplazar el vacío. En las zonas con una concentración alta de partículas en el aire, la contaminación de -- líquidos no protegidos, es un riesgo potencial.

Varios estudios (6,7,9,13) han demostrado que los líquidos intravenosos y los equipos suelen contaminarse mientras se usan. Cuanto mas tiempo está el recipiente en uso, mayor es la proliferación de bacterias y mayor la infección en el caso de que se produzca inadvertidamente la contaminación. El uso de recipientes de 250 ml. reduce el tiempo de uso del recipiente y el riesgo de que los líquidos a perfundir se pasen de fecha.

Varios estudios (7,8,9), han demostrado que una vez que los microorganismos capaces de crecer en el líquido de infusión son introducidos en un sistema en uso, pueden seguir multiplicandose en los tubos del aparato de infusión si se conserva el mismo equipo, pese a los cambios frecuentes de la botella. Otros estudios han revelado ulteriormente que el cambio rutinario completo una vez al día de todos los aparatos de administración, especialmente en el momento de reemplazar los artificios de infusión (catéteres de polietileno, agujas, etc.), puede disminuir enormemente el riesgo de contaminación extrínseca al impedir que los microorganismos introducidos se propaguen a gran escala (8).

Se debe comprender que la contaminación por contacto es el foco principal de infección y que, aunque las protecciones con flujo laminar impiden la contaminación aérea, no aseguran la esterilidad cuando se produce un fallo en la técnica aséptica.

RESUMEN

Se utilizaron cuatro soluciones parenterales diferentes de uso rutinario en hospitales; Solución Salina al -- 0.85%, Solución Dextrosa al 5%, Solución de Hartmann, Solución Manitol al 20%. Cada solución parenteral fué contaminada artificialmente con una pequeña alícuota de microorganismos que han demostrado ser contaminantes ambientales, como de éstas soluciones. Los microorganismos empleados fueron: Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis y Candida albicans.

Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por mililitro de solución cada 24 horas, por un espacio de siete días. Al mismo tiempo, se tomaron alícuotas para demostrar turbidez espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nanómetros cada 24 horas, por un espacio de siete días.

Para la demostración de la presencia de endotoxinas, se tomaron muestras de los frascos contaminados artificialmente con bacterias gramnegativas (Enterobacter aerogenes y Pseudomonas aeruginosa), se concentraron a Baño - María 10 veces y se procedió a la inoculación en el lomo de conejos rasurados para la observación del fenómeno de Shwartzman.

Quedó demostrado en este experimento la capacidad de ciertas soluciones parenterales, como en el caso de Solu-

ción de Hartmann, como excelente "medio de cultivo" para la mayoría de los microorganismos estudiados, así como soluciones parenterales prácticamente incapaces de sostener un medio propicio para el desarrollo de éstos, como es el caso de Solución Manitol al 20%.

También se concluyó que a pesar de no haber una turbidez visible, las soluciones parenterales son capaces de producir un fenómeno hemorrágico en un modelo experimental.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Elman R.
FLUID BALANCE FROM THE NURSE'S POINT OF VIEW
Am. J. Nurs. 49: 222, 1949.
- 2.- Williams J.T., Moravec D.F..
INTRAVENOUS THERAPY.
Cl. Pub. 41-42, 1967.
- 3.- Crossley K., Matsen M.
THE SCALP VEIN NEEDLE.
J. AM. MED. 220: 985, 1972.
- 4.- Aubaniac L.
L' INJECTION INTRA VEINEUSE SOUS-CLAVICULAIRE: ADVAN
TAGES ET TECHNIQUE.
Press. Med. 60: 1456, 1952.
- 5.- Morgan E., Fingher J.H., Sadik F.
EVALUATION OF LAMINAR FLOW AND NURSING STATION ENVI-
ROMENTS FOR THE PREPARATION OF INTRAVENOUS ADMIXTURE.
Am. J. Hosp. Ph. 29:1020-1024, 1972.
- 6.- Curry C.R., Quie P.G.
FUNGAL SEPTICEMIA IN PATIENTS RECEIVING PARENTERAL
HYPERALIMENTATION.
N. Engl. J. Med. 285: 1221-1225, 1971.
- 7.- Maki D.G., Goldmann D.A., Rhame F.S.
INFECTION CONTROL IN INTRAVENOUS THERAPY.
Ann. Intern. Med. 79: 867-887, 1974.
- 8.- Felts S.K., Schaffner W., Melly A.
SEPSIS CAUSED BY CONTAMINATED INTRAVENOUS FLUIDS.
Ann. Intern. Med. 77: 881-890, 1972.

- 9.- Robertson M.H.
FUNGI IN FLUIDS. A HAZARD OF INTRAVENOUS THERAPY.
J. Med. M. 3: 99, 1970.
- 10.- MICROBIOLOGICAL HAZARDS OF INTRAVENOUS INFUSIONS.
Lancet. 1: 43, 1974.
- 11.- Maki D.G. and Martin W.T.
NATIONWIDE EPIDEMIC OF SEPTICEMIA CAUSED BY CONTAMINATED INFUSION PRODUCTS. IV. GROWTH OF MICROBIAL PATHOGENS IN-FLUIDS FOR INTRAVENOUS INFUSION.
J. Infect. Dis. 131: 3, 1975.
- 12.- Hansen J.S., Hepler C.D.
CONTAMINATION OF INTRAVENOUS SOLUTIONS BY AIRBORNE MICROBES.
Am. J. Hosp. Pharm. 30: 326-331, 1973.
- 13.- Mackel D.C., Maki D.G., Anderson R.L., Rhame.
NATIONWIDE EPIDEMIC OF SEPTICEMIA CAUSED BY CONTAMINATED INTRAVENOUS PRODUCTS: MECHANISMS OF INTRINSIC CONTAMINATION.
J. Clin. Microb. 2: 486-497, 1975.
- 14.- Baird R.M., and Doery H.
IN-USE CONTAMINATION OF INTRAVENOUS FLUIDS.
J. Clin. Hosp. Pharm. 6: 183-188, 1981.
- 15.- Hugbo P.G., Imhanlahlml W.A.
GROWTH OF BACTERIA IN INTRAVENOUS FLUIDS UNDER SIMULATED ACTUAL-USE CONDITIONS.
Am. J. Hosp. Pharm. 40: 998-1001, 1983.
- 16.- Goldman D.A., Martin W.T., Worth J.W.
GROWTH OF BACTERIA AND FUNGI IN TOTAL PARENTERAL NUTRITION SOLUTIONS.
Amer. J. Surg. 126: 314-318, 1973.

- 17.- Mirtallo J.M., Caryer K., Schneider P.J., Ayer L.
GROWTH OF BACTERIA AND FUNGI IN PARENTERAL NUTRI-
TION SOLUTIONS CONTAINING ALBUMIN.
Amer. J. Hosp. Pharm. 38: 1907-1910, 1981.
- 18.- Buxton A.E., highsmith A.K., Garner J.S.
CONTAMINATION OF INTRAVENOUS INFUSION FLUIDS: EFE
CTS OF CHANGING ADMINISTRATION SETS.
Ann. Intern. Med. 90: 764-768, 1979.
- 19.- Goldmann D.A., Maki D.G.
INFECTION CONTROL IN TOTAL PARENTERAL NUTRITION.
J.A.M.A. 223: 1360-1364, 1973.
- 20.- Ryan J.A., Abel R.M., Abbott W.M., Hopkins C.C.
CATHETER COMPLICATIONS IN TOTAL PARENTERAL NUTRI-
TION.
N. Engl. J. Med. 290:757-761, 1974.
- 21.- Dillon J.D., Schaffner W., Van Way C.W., Meng H.C.
SEPTICEMIA AND TOTAL PARENTERAL NUTRITION.
J.A.M.A. 223: 1341-1344, 1973.
- 22.- Melly M.A., Meng H.C., Schaffner.
MICROBIAL GROWTH IN LIPIDS EMULSIONS USED IN PAREN-
TERAL NUTRITION.
Arch. Surg. 110: 1479-1481, 1975.
- 23.- Aguirre Sosaya F.J.
INFECCIONES NOSOCOMIALES
Infect. 3: 61-65, 1985.
- 24.- Allende Maldonado J.G., Peredo Lopez Velarde M.A.
RIESGO DE INFECCION INTRAHOSPITALARIA POR EL USO
DE CATETERES INTRAVENOSOS.
Infect. 8: 379-387, 1983.
- 25.- Zavala I.G., Bojórquez G.E.
INFECCIONES EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. AN-

- GEL LEAÑO".
Infect. 5: 367-374, 1982.
- 26.- Phillips I., Eykyn S., Laker M.
OUTBREAK OF HOSPITAL INFECTION CAUSED BY CONTAMINATED AUTOCLAVED FLUIDS.
Lancet. 10: 1258-1260, 1972.
- 27.- Lebowitz M.H., Masuda J.Y., Beckerman J.H.
THE pH AND ACIDITY OF INTRAVENOUS INFUSION SOLUTIONS.
J.A.M.A. 215: 1937-1940, 1971.
- 28.- Gaynor E., Bouvier C., Spaet T.H.
VASCULAR LESIONS: POSSIBLE PATHOGENETIC BASIS OF THE GENERALIZED SHWARTZMAN REACTION.
Science. 170: 986-988, 1970.
- 29.- From A.H., Spink W.W., Knight D., Gewurz H.
SIGNIFICANCE OF INTRAVASCULAR COAGULATION IN CANINE ENDOTOXIC SHOCK.
Inf. Imm. 11: 1010-1013, 1975.
- 30.- Hardaway R.M.
DISEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION IN EXPERIMENTAL AND CLINICAL SHOCK.
Am. J. Cardiol. 20: 161-173, 1967.
- 31.- Cavanagh D., Rao P.S., Sutton D.M., Bhagat B.
PATHOPHYSIOLOGY OF ENDOTOXIN SHOCK IN THE PRIMATE.
Am. J. Obstet. Gynecol. 108: 705-722, 1970.
- 32.- Vick J.A.
TRIGGER MECHANISM OF ENDOTOXIN SHOCK.
Am. J. Physiol. 206: 944-946, 1964.
- 33.- Lucas W.E., Kitzmiller J.L.
ROLE OF INTRAVASCULAR COAGULATION IN FELINE ENDOTOXIN SHOCK.
Surg. Gynecol & Obstet. 134: 73-77, 1972.

- 34.- Hardaway R.M., Hüsni E.A., Geever E.F.
ENDOTOXIN SHOCK. A MANIFESTATION OF INTRAVASCULAR
COAGULATION.
Ann. Surg. 154: 791-802, 1961.
- 35.- Hernandez R.M.
PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS
GRAMNEGATIVAS.
Infect. 8: 371-378, 1983.

