



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA
TESIS DE MAESTRÍA

Eficacia antiséptica de nanopartículas de plata en gel para reducir carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica.ECCA

PRESENTA: **FRANCISCO JAVIER TEJEDA NAVA**

Co-DIRECTORES DE TESIS

Dr. en C. Amaury de Jesús Pozos Guillén
Dr. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso

ASESORES

Dr. en C. Luis Octavio Sánchez Vargas.
M. en C. Javier Araújo Meléndez.
M en C. Mauricio Pierdant Pérez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA
TÍTULO DE TESIS

**Eficacia antiséptica de nanopartículas de plata dopadas en gel para
reducir carga microbiana oral en pacientes con ventilación
mecánica.ECCA**

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER TEJEDA NAVA

Firmas

DIRECTORES Dr. en C. Amaury de Jesús Pozos Guillén Dr. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso	
Asesores Dr. en C. Luis Octavio Sánchez Vargas. M. en C. Javier Araújo Meléndez. M. en C. Mauricio Pierdant Pérez	

Sinodales	
M. en C. Gabriela Moreno Meráz	
M. en C. Marco Ulises Martínez Martínez	
M. en C. Martín Magaña Aquino	
Dr. en C. Fidel Martínez Gutiérrez	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefa de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	M. en C. Mauricio Pierdant Pérez Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

RESUMEN

El objetivo del siguiente estudio clínico controlado aleatorizado tipo Add-On con número de identificación en *ClinicalTrials.gov*: **NCT02761525**, fue de evaluar la eficacia antiséptica de la aplicación tópica de nanopartículas de plata (AgNP's) dopadas en gel para reducir la carga microbiana oral de potencial patógeno, además de poder determinar la presencia de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter baumannii*, en pacientes adultos con ventilación mecánica que están en la Unidad de Cuidados Intensivos. La evaluación se realizó obteniendo un hisopado basal de saliva y seis horas después de la colocación del tratamiento experimental previa aleatorización, el cual está basado en gel acuoso (KY) dopado con nanopartículas de plata (AgNp's) en proporción 12ppm y placebo de gel sin AgNp's, única dosis. Dicho tratamiento se colocó posterior a la higiene oral que se lleva a cabo en estos pacientes. Se compararon las cuentas totales de microorganismos (MO) basales y finales, así como también se identificó la prevalencia de las diversas especies con cultivos en CHROMagar específicos, resultando según mediciones paramétricas de los conteos en base a un modelo lineal con una $p > 0.05$, como diferencia no significativa entre los grupos de tratamiento. La prevalencia de microorganismos en la UTI es en primer lugar *Enterococcus faecalis* (17%), posteriormente *Acinetobacter baumannii* (13%), en tercero y cuarto lugar de prevalencia *Candida albicans* (12%) siendo en mayor proporción la especie *S. Aureus* (12%) y *Staphylococcus* spp (10%) de éstas últimas. Se concluye que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el gel dopado con AgNp's y el placebo, para reducir las cuentas microbianas. Además de que se encontraron en boca MO que resultan ser causantes de diversas infecciones nosocomiales.

RESUMEN.....	i
ÍNDICE	ii
LISTA DE CUADROS, TABLAS, GRÁFICAS Y DIAGRAMAS	iv
RECONOCIMIENTOS, AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	v
ABREVIATURAS	vi
1 ANTECEDENTES	2
1.1 Infecciones nosocomiales.....	2
1.1.1. Definición.....	2
1.1.2. Causas y Tipos de IN.	2
1.2.3. Sépsis.	2
1.2.4. Neumonía.	2
1.2.6. Epidemiología de las infecciones Nosocomiales	3
1.2.7. APACHE II.....	3
1.4 Prevención y tratamiento de las enfermedades nosocomiales en UTI.....	6
1.5 Uso de plata y nanopartículas de plata (AgNp's).....	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
4.3 Objetivo secundario	14
5. SUJETOS Y MÉTODOS	15
5.1 Diseño del estudio.....	15
5.2 Lugar y duración.	15
5.3 Recolección de datos.....	15
5.4 Obtención de nanopartículas de plata e incorporación en gel.....	15
5.6 Método de muestreo	16
5.7 Criterios de selección.	16
5.7.1 Criterios de inclusión.....	16
5.7.2 Criterios de exclusión:.....	17
5.7.3 Criterios de eliminación.....	17
5.8 Recursos materiales:	17
5.9 Financiamiento:	18
6 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
6.1 Definición conceptual y operacional de las variables	19
6.1.1 Variable Dependiente	19
6.1.2 Variables Independientes	19
6.2 Plan de análisis, cálculo de tamaño muestral, aleatorización y cegamiento.	20
7 Plan de trabajo.....	21
7.1 Procedimientos de obtención de muestra del ensayo	21
7.2 Técnica de aplicación del tratamiento (gel con y sin AgNp's).....	22

7.3 Transporte de la muestra.....	22
7.4 Procedimientos microbiológicos.....	23
8. ASPECTOS ÉTICOS.....	23
9. RESULTADOS.....	25
9.1 Asignación.....	25
9.2 Características Generales de los pacientes.....	26
9.3 Diferencias según el modelo de regresión lineal.....	26
9.4 prevalencia de microorganismo en la unidad de cuidados intensivos.....	30
10 DISCUSIÓN.....	33
11. CONCLUSIONES.....	40
12. REFERENCIAS.....	41
ANEXO 1. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	53
ANEXO 2. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS.....	55
ANEXO 3.FICHA TÉCNICA K – Y.....	58
ANEXO 4 MONTAJE DE LOS MÉTODOS CLÍNICOS Y DE MUESTREO DEL PILOTO.....	59
Estudio piloto externo.....	59
ANEXO 5. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE MUESTRA DEL PACIENTE.....	60
ANEXO 6 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS.....	62
ANEXO 7. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.....	70
ANEXO 8 CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN.....	72
ANEXO 9. CARTA DE NO CONFLICTO DE INTERESES.....	74
ANEXO 10 CALIBRACIÓN INTRACLASE.....	75
ANEXO 11. MODELAJE PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CÓDIGOS PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	76
Códigos R y Rcmdr.....	77

LISTA DE CUADROS, TABLAS, GRÁFICAS Y DIAGRAMAS

CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Patógenos asociados a IN	5
Cuadro 2. Recomendaciones en cavidad oral para evitar riesgo de NAV. Tomado de “Guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica” 2013	8

TABLAS

Tabla 1. Características generales de pacientes intubados en UTI por tratamiento.	28
Tabla 2. Diferencias de las cuentas microbianas por grupo de tratamiento	31
Tabla 3. Prevalencia de los patógenos identificados en la mucosa oral de los pacientes antes del tratamiento y después del tratamiento por grupo de estudio	32

GRÁFICAS

Gráfica 1. Qqplot de Prueba de Shapiro Wilk no mostrando distribución normal.	29
Gráfica 2. Qqplot de Prueba de Shapiro Wilk mostrando distribución normal después de transformación Box-Cox.	29
Gráfica 3a. Gráfica de Barras mostrando diferencias entre conteos basal y final por grupo de tratamiento usando transformación Box-Cox	32
Gráfica 3b. Gráfica de caja mostrando diferencias entre conteos basal y final por grupo de tratamiento	33
Gráfica 4. Prevalencia de Microorganismos en la Unidad de Cuidados Intensivos	34
Gráfica 5. Coeficiente de correlación intraclase	82

DIAGRAMAS

Diagrama 1: Diagrama de flujo de la muestra	27
---	--------------------

RECONOCIMIENTOS, AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco a Dios en primera instancia. A Saray amada esposa y ejemplo a seguir, a mis hijas por que de forma indirecta siempre han soportado tantas actividades compartidas incluido este grado académico y que amo más que a mi vida. A mis padres y hermanos que siempre me apoyan, a todos ellos y ellas les dedico esta tesis. Agradezco a mis Directores de tesis Doctores Pozos y Gordillo por aceptar el reto y siempre estar al pendiente, a mis asesores por su paciencia y aportación, especialmente al Dr Luis Octavio Sánchez por tanta dedicación y tolerancia, pero principalmente reconocimiento y agradecimiento por sus conocimientos y por haberme contagiado de su pasión por el mundo microbiológico. A mis profesores y amigos del programa de Maestría en Ciencias en Investigación Clínica; al personal del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, específicamente a quienes me ayudaron a llevar a cabo este trabajo. Agradezco a CONACYT, a los miembros del cuerpo académico que laboran en el laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología Bucal, a la Facultad de Estomatología y Medicina de la UASLP, por su aportación a lograr terminar estos estudios.

ABREVIATURAS

AgNp's: Nanopartículas de plata

AgNO₃: Nitrato de plata

CDC: Center of Disease Control

CI: Catéteres intravasculares

CHX: Gluconato de Clorhexidina

GPDTNAV: Guía para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica asistida

HC" DIMP": Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

IN: Infecciones nosocomiales

MO: Microorganismos

MR: Multiresistentes

NAV: Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica Asistida

NP: Nanopartículas

PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)

TET: Tubo Endotraqueal

UTI: Unidad de Terapia Intensiva

VMA: Ventilación Mecánica Asistida

1 ANTECEDENTES

1.1 Infecciones nosocomiales

1.1.1. Definición. Las infecciones nosocomiales (IN) son las contraídas durante las estancias hospitalarias a partir de microorganismos presentes en el ambiente o provenientes de la microbiota propia del paciente hospitalizado. Se presentan generalmente después de 48 hr. de ingreso y a pesar de los avances científicos recientes muestran alta morbi-mortalidad [1].

1.1.2. Causas y Tipos de IN. Entre las causas relacionadas a IN están las propias de los pacientes como cirugías, prótesis, injertos e implantes, trasplantes, administración de antibióticos de amplio espectro, corticoterapia, venoclisis, punciones, sondas, catéteres, tubos endotraqueales, drenajes y alimentación parenteral [1].

Los tipos de IN son sépsis, neumonía, neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones en vías urinarias, infecciones en el sitio quirúrgico, por artefactos endovenosos o catéteres.

1.2.3. Sépsis. Se define como infección grave relacionada a disfunción orgánica múltiple [2]. Cuando se debe a cierto tipo de microorganismos (MO) por ejemplo bacterias viables en la sangre circulante se denomina bacteremia [3].

1.2.4. Neumonía. La neumonía es la infección del pulmón a menudo acompañada de inflamación o como lo definen actualmente: neumonía asociada al cuidado de la salud HCAP (healthcare associated pneumonia). Es un concepto de neumonía propuesto por la American Thoracic Society (Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América) desde el 2005. Ésta categoría está situada entre la neumonía adquirida en la comunidad y la neumonía adquirida en el hospital con respecto a las características causales [4]. Una complicación en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI), es la neumonía asociada a ventilación mecánica.

1.2.5. Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV). Se define como la infección del parénquima pulmonar que ocurre en un paciente que ha sido asistido por ventilación mecánica dentro de las últimas 48 horas [5].

La NAV es la infección nosocomial más común en pacientes que están gravemente enfermos, con una tasa de 2.5 a 12.3 episodios por 1000/días de ventilador y se produce del 9.3 al 23.5% de los pacientes que reciben ventilación mecánica (VM). La mortalidad hospitalaria de los pacientes con VM es significativamente mayor que la de los pacientes sin ella. Además está asociada con mayores costos de atención médica y es la primera causa de IN en pacientes de las UTI incrementándose la estancia hospitalaria de 5-7 días, principalmente causada por MO resistentes, los cuales forman biopelículas sobre los dispositivos biomédicos, en particular sobre los tubos endotraqueales (TET) [6–8] siendo muy importante que el tiempo de intubación se asocia con neumonía [9], lo que genera un incremento en el costo por estancia hospitalaria con estimaciones hasta de 10,000 a 25,000 dólares [7].

1.2.6. Epidemiología de las infecciones Nosocomiales. Weber y cols. en el 2012 [10] muestran que la frecuencia de IN es del 77.7% en el torrente sanguíneo, 74.5% en el sitio quirúrgico, 62.3% son del tracto urinario, y 18.6% de las vías respiratorias. En México la proporción atribuible de mortalidad por IN según López Herrera y cols. en el 2012 [11] fue de 25.15%. El 20.9% de las IN en el torrente sanguíneo, 11.4% en el sitio quirúrgico, 21% son del tracto urinario, y 24% de las vías respiratorias. En otros reportes mencionan que afectan aproximadamente del 10% al 13% de los pacientes hospitalizados y casi el 70% de las IN se deben microorganismos (MO) multiresistentes (MR) [12,13].

1.2.7. APACHE II. Basado en lo anterior, las IN incrementan el riesgo de que un paciente pueda fallecer y resulta importante contar con una escala para poder englobar lo que el paciente padece en el momento de su estancia en la UTI [14]. Un instrumento muy útil para evaluar el estado de salud agudo o crónico del paciente es la escala APACHE II (por sus siglas en inglés: Acute Physiology and Chronic Health

Evaluation II); la cual aporta información para conocer el riesgo que tiene a morir, basado en una puntuación que va de 0-71 [15]. Este índice utiliza la información obtenida a partir de historia clínica del paciente, e incluye temperatura, presión arterial media, estado del corazón, respiración, oxigenación, pH arterial, niveles séricos de Na, K y creatinina, hematocrito, recuento de leucocitos y la edad [15].

1.3 Microbiota oral causal de NAV. No sólo la gravedad de los padecimientos propios del paciente o la razón que motivó su estancia en la UTI pueden generar complicaciones que lo lleven a la muerte, también están los MO, que puedan estar localizados en boca, piel, intestino o en cada parte del organismo humano que comunica el medio interno con el exterior; estos desempeñan un papel clave en la etiología de las IN, las cuales pueden manifestarse y progresar de diferentes maneras entre los individuos [16].

La mayoría de estos MO superan la respuesta inmune mediante la formación de biopelículas mixtas que se conforman tanto de comensales como de patógenos potenciales. Dentro de la cavidad oral, en las células epiteliales, esmalte dental, saliva, otras superficies dentales, tubo endotraqueal (TET), aparatología fija o removible crean ambientes adecuados para el establecimiento de las biopelículas con especies mixtas, incrementando así la patogenicidad por este sistema microbiano complejo [17].

La higiene deficiente puede generar enfermedad, dañando el complejo periodontal [18], motivando la formación de biopelículas mixtas, que aunado a lo anterior, derivan en IN [19,20].

En los reportes del CDC del 2006-2007 [21] y de 2009-2010 [12] aislaron a los patógenos asociados a IN más importantes como muestra el **Cuadro 1**. En Brasil en un lapso de tres años, se evaluó la incidencia de infecciones nosocomiales en las UTI de diferentes hospitales [22]. En México las infecciones por *Staphylococcus aureus*, y *Candida albicans* se reportan muy similar [23]. En Chihuahua hubo algunos

datos diferentes [24]. Según los datos obtenidos en el Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto (H.C.D.I.M.P.), San Luis Potosí, del Informe Anual de Infecciones Nosocomiales 2013 a partir de aspirados bronquiales de pacientes son diferentes con respecto a otras partes del mundo. Dichos MO estan presentes también en boca de los pacientes intubados.

Cuadro 1. Patógenos asociados a IN (%)

Patógeno	2006- 2007	2009- 2010	Brasil	México Ángeles Garay	México Chihuahua	México S.L.P. H.C.I.M.P
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.5	15.6	7.4	15.9	13.08	10
<i>Enterococcus spp</i>	12.1	13.9	-	-	-	11
<i>Escherichia coli</i>	9.6	11.5	12.57	-	-	4
<i>Candida spp</i>	6.8	9.5	19.4	11.8	23.4	13
<i>Enterobacter spp</i>	4.8	4.7	-	-	19.1	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.7	1.8	20	-	-	29

Como se observa en el cuadro no solo las bacterias pueden ser agentes etiológicos de enfermedades nosocomiales La infección sistémica por *Candida spp* con o sin candidemias asociadas es la más prevalente en cualquier parte del mundo. Del 95 al 97% de las infecciones nosocomiales asociadas a hongos, están generadas por 5 especies principalmente: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. La principal fuente de infección es la endógena o por colonización previa ya sea de mucosas o piel [25].

Se ha comprobado con análisis genéticos que éstos MO orofaríngeos son las mismas cepas tanto en boca como en tracto respiratorio, generando así IN como neumonía que daña las vías aéreas bajas [26–28]. Estos hallazgos sugieren que algunos MO de la biopelícula dental o de las mucosas, son un importante reservorio que pueden asociarse a esta complicación de vías aéreas [29]. Por lo tanto, la formación de biopelículas a partir de la microbiota oral puede ser un depósito para patógenos respiratorios o generalizados en pacientes hospitalizados en UTI. Así mismo, se ha demostrado que las biopelículas mixtas generan MO más virulentos, lo que trae como consecuencia que sean más difíciles de tratar [30].

1.4 Prevención y tratamiento de las enfermedades nosocomiales en UTI

Tomando en consideración que las IN se ocasionan por los MO antes mencionados, existen una serie de estrategias propuestas para disminuir estas infecciones en las UTI [31]. Principalmente el uso de TET deriva en NAV. Coppadoro y cols. [32]mencionan que se han desarrollado tres modificaciones: recubrimientos de los tubos con antimicrobianos, la adición de un canal de aspiración para la eliminación de las secreciones orofaríngeas, y la modificación en el diseño del manguito. Bergmans y Berry [33,34]mencionaron recomendaciones para el cuidado de los pacientes en estado crítico. Los directamente relacionados a la boca son, frecuencia y duración de la limpieza; herramientas de evaluación oral y protocolos de higiene oral. La Secretaría de Salud en el 2013 aportó una “Guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica” [35,36], en donde se especifican los diferentes procedimientos y maniobras que se deben llevar a cabo para poder disminuir el riesgo de NAV. Éstas incluyen el cuidado en la posición al paciente, uso de terapia farmacológica profiláctica, limitar los días de estancia en la Unidad, desinfección de superficies, lavado de manos, en caso de requerir descontaminación del tubo; además de que no se sugiere usar antimicrobianos sistémicos a menos que se amerite el caso. Se mencionan además los cuidados orales en estos pacientes y que son importantes como prevención de IN principalmente NAV.

1.4.1. Cuidados Orales. La mucosa oral debe ser considerada un depósito sustancial de patógenos respiratorios, y la descontaminación de la orofaringe con soluciones antisépticas reduce la incidencia de infecciones respiratorias adquiridas [37], una revisión de la literatura demostró que el uso de gluconato de clorhexidina (CHX) en solución como un complemento a la eliminación mecánica de la placa suprime la colonización de la placa dental por MO de potencial patógeno [18].

En un meta-análisis COCRANE [38], se demostró que el uso de (CHX) al 0.12% a razón de 15 ml, cada 12 horas, en enjuague oral, inmediatamente después de la intubación y continuar hasta 24 hrs después del retiro del TET disminuye la tasa de infecciones respiratorias en un 40%; aunque no se ha demostrado que modifique la mortalidad. La (CHX) se ha utilizado en pacientes con ventilación mecánica debido a su capacidad para unirse a los tejidos orales con la posterior liberación lenta de propiedades antisépticas y por lo tanto un largo período de acción antibacteriana. Sin embargo Shi y Yamaguchi [39,40] demostraron que es imposible eliminar por completo las biopelículas. Las imágenes del láser confocal y por medio de la microscopía electrónica de transmisión, revelaron que el tratamiento con CHX no destruyó las biopelículas formadas sobre la superficie de los tubos endotraqueales. Así las residuales podrían servir como un andamio para la formación de nuevas biopelículas que puedan propiciar que otros MO las invadan generando IN [41]. Las recomendaciones que se deben llevar a cabo a nivel bucal se incluyen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Recomendaciones en cavidad oral para evitar riesgo de NAV. Tomado de “Guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica” 2013



Investigar los factores de riesgo reconocidos para NAVM relacionados al huésped:

1. Colonización de la vía respiratoria alta y del tracto digestivo por microorganismos patógenos
2. Presencia de placa dentobacteriana
3. Desnutrición
4. Obesidad
5. Edad avanzada
6. Prematurez y bajo peso al nacer
7. Enfermedades crónico degenerativas
8. Enfermedad pulmonar subyacente
9. Depresión del nivel de conciencia
10. Enfermedad neurológica/neuromuscular
11. Inmunosupresión
12. Cirugía torácica o abdominal alta
13. Estancia hospitalaria prolongada
14. Género masculino
15. Re-intubación
16. Alimentación enteral
17. Escala de coma de Glasgow <9
18. Calificación de APACHE elevada
19. Malformación pulmonar, diafragmática y/o de corazón
20. Sepsis y falla orgánica



Se recomienda el uso de Gluconato de Clorhexidina al 0.12% a razón de 15 mL, c/12 horas durante 30 minutos, en enjuague bucal, inmediatamente después de la intubación y continuar hasta 24 horas después del retiro del tubo endotraqueal.

Al usar antisépticos orales para el cuidado de los pacientes en UTI, es indispensable comprobar que son la mejor alternativa y que no existe posibilidad de que haya situaciones adversas con el uso de los mismos; por ejemplo, Lachapelle [41] hace una revisión comparativa de las propiedades irritantes y alergénicas de los antisépticos más importantes utilizados en la actualidad. Se menciona que la

información sobre las posibles propiedades alergénicas de la plata no se ha reportado, pero que no se considera un alérgeno de contacto. Pero con respecto a la clorhexidina menciona que puede haber mucositis, dermatitis de contacto y en algunas ocasiones se han reportado reacciones alérgicas. Como hemos visto anteriormente el TET se considera la principal causa para IN como la NAV [42]. Es por eso que una alternativa con muy buenos resultados es el uso de TET recubiertos con Nanopartículas de plata (AgNp's) [43–46], demostrando que las AgNp's son una alternativa viable para el control de las IN.

1.5 Uso de plata y nanopartículas de plata (AgNp's)

Se ha sabido desde la antigüedad que la plata y sus compuestos son agentes antimicrobianos eficaces [47,48]. En el siglo XIX, las infecciones microbianas se trataron con 0.5 % de Nitrato de plata (AgNp'sO₃), que aún se usa para la prevención de infecciones en quemaduras [49]. Cuando comenzó la era de los antibióticos con el descubrimiento de la penicilina, el uso de la plata disminuyó lentamente. En los últimos 20 años, las investigaciones referentes a nanopartículas (NP) han tenido un aumento abrumador, así como de productos relacionados con la nanotecnología. En la actualidad, debido a la aparición de microorganismos resistentes a los fármacos convencionales, el uso de la plata para el tratamiento de infecciones ha ganado una vez más importancia, principalmente sintetizando (AgNp's) nanopartículas de plata [50]. El método ampliamente estudiado para sintetizar AgNp's es la reducción controlada de sales de plata. Esta reducción se logra usando un producto químico como agente reductor, aunque también puede ser a través de la reducción electroquímica o fotoquímica [51]. Las AgNp's son grupos de átomos de plata que varían de tamaño de 1 a 100 nm, son conocidas por ser seguras, al no ser agentes antimicrobianos tóxicos para el cuerpo humano, pudiéndose utilizar para evitar infecciones y controlar crecimiento microbiano [52]. Además, de que poseen actividad antifúngica, específicamente en contra de *Candida albicans* [53]. El uso en Medicina y en otras áreas es muy variado y como ejemplos están en dispositivos como catéteres, válvulas, vendas, cremas tópicas, tubos endotraqueales (TET); además de otros usos como agente antimicrobiano en pinturas y textiles [54]. Se ha planteado

que la utilización de AgNp's esféricas con diámetros que oscilan entre 40 y 60 nm a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, son eficaces para poder servir como microbicidas *in vitro*, y se sugiere además que el tiempo mínimo en el que se recomienda que pueda actuar generando ésta acción sea de de 6 a 8 hrs. en el sitio de aplicación [55]. De las características más importantes de las AgNp's es que éstas, no se absorben por la mucosa oral ni gástrica.

En los modelos farmacocinéticos basados en la fisiología (Physiologically Based Pharmacokinetic Model) [56] se demuestra que la plata no se absorbe en el tracto gastrointestinal, ni pasa hacia la circulación sanguínea sistémica, sino se excreta directamente a través de las heces. Otra característica que tienen, es su baja probabilidad de resistencia por parte de los MO en comparación con los antibióticos[57] o antisépticos[49].

El mecanismo de acción de las nanopartículas Hajipur [58] específicamente AgNp's es muy variado. Se ha planteado que se depositan en la pared celular microbiana y que ejercen un efecto tóxico mediante la inactivación de sus enzimas esenciales o llegando directamente hasta su material genético, impidiendo la capacidad de replicarse, principalmente en algunas especies gramnegativas. También se ha propuesto que la producción de especies reactivas de oxígeno tales como los aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, y radicales hidroxilo generan daño a los MO. Estos radicales tóxicos tienen una potente actividad bactericida, por lo que interrumpen la formación de biopelículas.

Los compuestos de plata y las AgNp's ya han sido utilizados como material de restauración dental, cementos endodónticos para retro obturación, implantes dentales y soluciones inhibidoras de caries [59].

En la Universidad de UTAH en Estados Unidos, se realizó un ensayo clínico controlado [60] a simple ciego, con intención a tratar, en el cual se evaluaron soluciones comerciales de 10 y 32 partes por millón de AgNp's (esféricas, de

59.8nm±20nm) en sujetos sanos, a los cuales posterior a la ingesta de esta solución, se les realizaron estudios metabólicos de laboratorio, dichos estudios fueron hemograma, análisis de orina, esputo inducido, y además se les realizó resonancia mAgNp'sética de abdomen y de pecho. Los resultados que muestran concluyen que no se identificaron cambios importantes en los estudios metabólicos, tampoco se observaron cambios en corazón, pulmones u órganos abdominales. La exposición de la solución comercial de nanopartículas de plata, no muestra cambios clínicamente importantes en el metabolismo humano, ni en los estudio hematológicos, en orina, o en los hallazgos físicos o morfología de imágenes.

En trabajos previos de tesis de maestría se han incorporado nanopartículas de plata a los selladores de foseas dentales y adhesivos de uso odontopediátrico y ortodóntico; generando tesis de maestría y obteniendo resultados satisfactorios en el control de microorganismos principalmente generadores de caries dental [61].

Por parte de la Facultad de Estomatología de la UASLP, un estudio utilizó nanopartículas de plata, oro y óxido de zinc, con un tamaño de entre 40 y 60 nm y comprobando efectos bacteriostáticos y bactericidas sobre *Streptococcus mutans*. Las nanopartículas de plata comparadas con las de oro y óxido de zinc, resultaron ser las de menor concentración en las cepas de *Streptococcus mutans*, siendo los resultados que la CMI (concentración mínima inhibitoria) de nanopartículas de plata contra el *S. mutans* de 4.86 µg/ml y la CMB (concentración mínima bacteriostática) de 6.25 µg/ml, respecto a las de oro y óxido de zinc [62].

Otro estudio con el mismo equipo de trabajo, probó la citotoxicidad de las nanopartículas de plata en tejido periodontal humano y demostró que las nanopartículas de 100nm no producen cambios en la viabilidad celular. Además, la concentración de nanopartículas de plata de ≤ 10 y ≤ 20 nm en la que se observó un efecto de disminución de viabilidad celular corresponde a 500 µm (54µg/ml) en exposición directa por 7 días.[52]

Sin embargo, a la fecha no existen trabajos previos que hayan evaluado la eficacia de las AgNp's dopadas en gel a la concentración propuesta, al realizar búsqueda en las bases de datos de index nacionales o internacionales como son PubMed, LILACS, IMBIOMED, Embase, ScienceDirect, MedlinePlus o SpringerLink. La revisión de la literatura muestra que nuestro trabajo es el primero en evaluar dicha eficacia.

Por tanto, basado en lo anterior, con este proyecto se busca medir la efectividad antiséptica a base de nanopartículas de plata dopadas a un gel inerte, para reducir la carga de algunos microorganismos de gran relevancia nosocomial como son: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter baumannii*.

2. JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones nosocomiales en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, pueden ser fatales, dado que los MO involucrados regularmente revelan patrones de multirresistencia antimicrobiana. La evidencia científica sustenta la relación existente de la causalidad de estas infecciones nosocomiales por diversos MO que forman parte de la microbiota oral. Dentro de las guías para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica asistida, se incorporan puntualmente procedimientos de higiene oral teniendo como fin reducir las cargas microbianas orales y así, reducir particularmente, el riesgo de neumonías asociadas a la microbiota oral. Por ello, la búsqueda de alternativas preventivas y terapéuticas que den un valor agregado en la reducción de cargas microbianas orales además de las ya estipuladas, han resultado en diversos intentos, tales como las modificaciones de materiales de los dispositivos biomédicos, el uso de nuevos compuestos activos de aplicación sistémica o tópica, la mejora de los procedimientos físico-mecánicos de higiene dental/oral, entre otras. En este sentido, las nanopartículas de plata (AgNp's), resultan una alternativa atractiva dada su eficacia antimicrobiana comprobada en piel, superficies inanimadas, y otras mucosas que de acuerdo a la revisión que hemos realizado hasta hoy no incluyen la aplicación tópica en la mucosa oral.

Basado en lo anterior, se realiza el presente ensayo clínico controlado aleatorizado, para demostrar la eficacia de la formulación propuesta de nanopartículas de plata dopadas a un gel comercial (K-Y®) para potenciar el efecto de los cuidados que ya se establecieron en las guías para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica asistida (GPDTNAV) realizadas en pacientes ingresados en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" (HC "DIMP") así disminuir con su aplicación tópica oral la carga microbiana de los principales microorganismos de potencial patógeno, involucrados en neumonía asociada a ventilación mecánica asistida, como son: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter baumannii*.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tendrá eficacia antiséptica la aplicación tópica de nanopartículas de plata dopadas en gel para reducir la carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica asistida?

3. HIPÓTESIS

La aplicación tópica de nanopartículas de plata dopadas en gel tiene eficacia antiséptica para reducir la carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica asistida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia antiséptica de la aplicación tópica de nanopartículas de plata dopadas en gel contra gel sin dopar (placebo) para reducir la carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar cuentas microbianas orales totales basales en pacientes con ventilación mecánica antes de la higiene bucal.
2. Determinar cuentas microbianas orales totales finales en pacientes con ventilación mecánica con muestra a las 6 hr posteriores a la aplicación tópica de nanopartículas de plata dopadas en gel
3. Determinar cuentas microbianas orales totales finales en pacientes con ventilación mecánica con muestra a las 6 hr posteriores a la aplicación tópica de placebo.
4. Comparar cuentas totales basales contra finales por grupo de tratamiento.

4.3 Objetivo secundario

1. Determinar la presencia de microorganismos de potencial patógeno incluyendo: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter baumannii*, en la boca de pacientes con ventilación mecánica.

5. SUJETOS Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio.

El presente estudio es un ensayo clínico controlado aleatorizado (ECCA) tipo ADD-ON

El tipo de estudio ADD-ON, se refiere a una variante de los ensayos clínicos en donde no se les modifica a los pacientes los tratamientos o maniobras a realizar por la afección principal, pero se añaden otras alternativas terapéuticas para incluir mejor beneficio al padecimiento. Esta inclusión generalmente es la intervención a evaluar en la investigación. En el presente protocolo significa que no se modificaron las maniobras para cuidados de los pacientes en UTI intubados, sólo se añadió el tratamiento experimental con gel, ya sea con AgNp's o sin ellas.

5.2 Lugar y duración.

Los pacientes incluidos son adultos intubados internados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P.

Los procedimientos de laboratorio y los análisis de resultados se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología de la UASLP.

La duración de recolección de datos fue de octubre 2014 a julio 2015.

5.3 Recolección de datos.

Se utilizó una ficha de recolección de datos propuesta para este trabajo, obtenidos de los expedientes en la UTI al momento de la inclusión del paciente al estudio.

ANEXO 1

5.4 Obtención de nanopartículas de plata e incorporación en gel

Se usaron nanopartículas de plata que han sido obtenidas mediante un proceso patentado con el siguiente título y número de patente: *Proceso para fabricación de plata metálica nanométrica, monodispersa y estable y producto obtenido. International application no.: PCT/MX2007/000047* [63].

En el presente trabajo tanto la sintetización, caracterización y dopaje fue realizado en el laboratorio de la facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las AgNp's El método de obtención de las nanoparticulas se encuentra patentado y se están buscando nuevas aplicaciones de estas, la metodología completa de dicha obtención forma parte del proceso protegido bajo la patente mencionada. La información de las nanoparticulas se presenta disponible en lo referente a resultados previos de pruebas de citotoxicidad realizadas a las nanoparticulas que aseguran su uso humano seguro en el ANEXO 2

La formulación de nanopartículas de plata en gel que se empleó en este protocolo, se obtuvo mezclando AgNp's (esféricas de 40 a 60 nm) dopadas a un gel comercial (K-Y®) mediante agitación mecánica constante durante 30 minutos a 180 rpm. La concentración final de AgNp's fue de 12.5 µg/mL, la que se determinó basados en estudios que el mismo grupo que las sintetiza sugiere, siendo la concentración máxima tóxica [64]. El gel al que se le incorporaron las nanopartículas y el que se usó como placebo control, es de la marca K-Y® de Johnson y Johnson. ANEXO 3.

5.6 Método de muestreo

Muestreo secuencial no probabilístico. En todos los casos se mantuvieron las acciones profilácticas orales según las recomendaciones de la "Guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica" [36] 2013 vigentes en el hospital para el cuidado de los pacientes de la UTI, que incluye la limpieza con clorhexidina al 0.2% cada 8 hrs. a todos los pacientes intubados sin excepción. Para la obtención de la muestra se llevó a cabo la técnica de Scannapieco y cols [70] con algunas modificaciones, descrita en el apartado 7.1.

5.7 Criterios de selección.

5.7.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con mínimo 24 hrs de aplicación de tubo Endotraqueal [65] para soporte ventilatorio y que estuvieron con sonda nasogástrica, internados a la

UTI del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”

2. Pacientes con mínimo 24 hrs de ingreso a la UTI .
3. Pacientes con sedo-analgésia, en coma o coma inducido.
4. Ambos sexos.
5. Mayores de 15 años de edad
6. Que cuenten con el consentimiento informado firmado por un familiar o responsable legal del paciente.

5.7.2 Criterios de exclusión:

1. Que el paciente no este participando en otro estudio que cause conflicto con el presente ensayo.
2. Pacientes que presenten bronquiectasias, hemoptisis grave o masiva, fibrosis quística.
3. Pacientes con sensibilidad conocida a la plata.
4. Pacientes que presentaron intubación difícil reportada en el expediente.
5. Pacientes que por su estado físico no permitiera la realización del examen oral, adecuada toma de la muestra o aplicación del gel.
6. Mujeres embarazadas
7. Pacientes con mucositis oral

5.7.3 Criterios de eliminación

1. Pacientes que se iniciaron en el protocolo y que durante el transcurso del estudio hayan fallecido antes de la primera o segunda muestra.
2. Pacientes que sean trasladados a otro hospital antes de la segunda muestra.
3. Pacientes que entrando al estudio antes de la segunda muestra hayan sido extubados.

5.8 Recursos materiales:

Se contó con la infraestructura del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología Bucal, así como con los insumos necesarios para la elaboración de las pruebas microbiológicas en el laboratorio. Lo concerniente a la formulación de

nanopartículas de plata y su colocación en gel fueron suministrados y dopados por personal del Laboratorio de la Facultad Ciencias de la UASLP.

5.9 Financiamiento:

Para el desarrollo de este proyecto, el presupuesto para adquirir diversos materiales y reactivos necesarios se planificaron dentro de una línea de investigación del cuerpo académico “Diagnóstico Molecular, Patología y Microbiología Experimental Odontológica”, por lo que se estableció como parte del presupuesto con que cuenta dicho cuerpo académico durante el tiempo que duró el muestreo.

Los costos de la obtención, caracterización e incorporación de las AgNp's en gel, fueron sufragados y proporcionadas por parte del grupo de trabajo la Facultad de Ciencias, cuyo responsable es el Dr Facudo Ruiz.

Se firmó por parte de los investigadores involucrados una carta de no conflicto de intereses ANEXO 7.

6 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.1 Definición conceptual y operacional de las variables

6.1.1 Variable Dependiente

Código	Nombre	Significado	Escala de Medición	Indicador
TOTALM2	Carga Microbiana Postratamiento	Se midió en función de unidades formadoras de colonias UFC del promedio total de los microorganismos a estudiar	Conteos	Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)

6.1.2 Variables Independientes

Código	Nombre	Significado	Escala de Medición	Indicador
TOTALM1	Carga Microbiana Basal	En muestra tomada antes de la aplicación del tratamiento	Conteos	UFC/mL
Tratamiento	Tratamiento	Gel KY dopado con Nanopartículas de plata y sin nanopartículas de plata	Dicotómica	a , b
TI	Tiempo de intubación	Tiempo en horas a partir de que el paciente fue intubado, con los datos obtenidos del expediente.	Continua	Horas
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health	Clasificación de severidad o gravedad de	Continua	0-71

	Evaluation II	enfermedades		
AM	Antimicrobiano	Tipo de uso de medicamento antimicrobiano al incluirlo	Categórica dicotómica	0=no 1=si

6.2 Plan de análisis, cálculo de tamaño muestral, aleatorización y cegamiento.

Se realizó análisis de concordancia del observador, usando correlación intraclase según Bland y Altman utilizando una base de datos con los conteos de UFC en placas de AST (Agar Soya-Trypticaseína) por duplicado con 22 observaciones.

El análisis descriptivo de cada variable incluida se reportó como media y desviación estándar cuando las variables tenían escala continua si su distribución era normal, y el equivalente no paramétrico en caso contrario. Las variables con escala categórica se reportaron como frecuencia o porcentaje.

Los resultados se analizaron con el siguiente modelo lineal:

$$\text{TOTALM2} \sim \text{TOTALM1} + \text{Tratamiento} + \text{TI} + \text{APACHE II} + \text{AM}$$

El modelo tiene cinco grados de libertad. Según este modelo se calcula con diez a veinte repeticiones por cada grado de libertad y se necesitaron un mínimo de entre 50 y 100 pacientes para llevar a cabo el proyecto, según Peduzzi, Concato y Feinstein [66,67].

Al ser la variable dependiente un conteo se verificó que no tuvo criterios de una distribución normal, por tanto, se realizó una transformación para ajustarla a la normalidad según el método de Box y Cox (transformación Box-Cox) [68]. Las variables explicativas son conteo, dicotómicas y continuas, con un grado de libertad cada una.

La aleatorización de los pacientes se asignó por bloques para dos tratamientos de acuerdo a una lista generada con el software R y R-commander en su versión más reciente, utilizando bloques de asignación al azar con la función `block.random()` del paquete `psych` [69]. Este protocolo se consideró viable pues en promedio llegan a la UTI 650 pacientes anuales, 48 por mes, existen 10 camas en la UTI.

7 Plan de trabajo

La primera etapa del proyecto consistió en la autorización del comité de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica y posteriormente se obtuvo el registro de aprobación del proyecto en el departamento de enseñanza y la autorización del comité de ética del Hospital Central Dr Ignacio Morones Prieto con el número 93-14 del 26 de septiembre del 2014. Se entregó una copia al responsable de la Unidad de Cuidados Intensivos tanto del protocolo como de la carta de aceptación del protocolo. Después, se realizó el registro del protocolo de investigación en el portal de <http://clinicaltrials.gov>, obteniendo el número de registro **NCT02761525**.

7.1 Procedimientos de obtención de muestra del ensayo

Los pacientes intubados con las especificaciones del TET según la NOM-134- SSA1-1995 [65] estuvieron bajo sedo-anestesia, estado de coma o coma inducido, además de que estaban alimentados por sonda nasogástrica. No se modificaron los procedimientos específicos correspondientes para su atención en la UTI según la guía clínica titulada: Prevención, Diagnóstico y tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica. Los datos se obtuvieron del expediente del paciente incluyendo el monitoreo de las radiografías de tórax, eventos adversos, duración de la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UTI). Se incluyeron en la ficha de recolección de datos, la evaluación APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) que calculó el residente de UTI en turno. El examen oral y la toma de muestra para el cultivo se realizó en la UTI utilizando las medidas universales de barrera de manera sistemática (barreras desechables). Se realizó una toma de muestra basal para identificación de los microorganismos a cuantificar, así como un muestreo a las 6 hrs, posterior a la aplicación del tratamiento propuesto.

Para obtener la muestra de saliva, se realizó la técnica según Scannapieco y cols [70] con algunas modificaciones, la cual consistió en obtener saliva mediante un hisopado de la mucosa oral por cuadrantes y cerca del TET (siguiendo el margen gingival, paladar, dorso de lengua y piso de boca, usando la punta de algodón de un hisopo); posteriormente el hisopo se introdujo en caldo YPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) para su transportación al laboratorio.

El hisopado que se realizó fue iniciando del lado contrario a la colocación del TET, sin sacarlo de la boca, llevándolo a la zona retromolar, y con movimientos semicirculares se recorrió la mucosa labial superior hasta el fondo de saco, continuando hasta zona retromolar del lado contrario, mucosa labial inferior, siguiendo según el caso “las manecillas del reloj” o al contrario. Se tomó muestra de lengua, paladar y piso de boca. Al finalizar se colocó en un tubo Falcon con caldo de cultivo, para transportarlo al laboratorio. Posteriormente, el personal del hospital llevó a cabo los cuidados que se indican en la GPDTNAV, mismos que se llevan a cabo de forma rutinaria en la UTI para pacientes intubados, y siguiendo la normatividad establecida en el HC”DIMP”.

7.2 Técnica de aplicación del tratamiento (gel con y sin AgNp's)

Se colocó la única aplicación del gel con o sin AgNp's, repartiendo un 1 mL con una jeringa hipodérmica, sin aguja, pre-dosificada, por paciente, previa aleatorización en la cavidad oral, siguiendo el mismo proceso de obtención de muestra reparténdolo con un hisopo nuevo y estéril. [70].

7.3 Transporte de la muestra

Las muestras se transportaron al laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología en un periodo no superior a las tres horas posteriores a la toma de la muestra, que se colocaron en una hielera de unicel. Se cuidó que los tubos se encontraran correctamente rotulados y siempre colocados en la base de unicel específicamente diseñada para éstos con la boca hacia la parte superior para evitar vaciamientos o contaminaciones. Los tubos se identificaron con: el número de folio, fecha y hora de la toma de muestra, para proceder a su siembra.

7.4 Procedimientos microbiológicos

En el laboratorio se homogeneizó la muestra utilizando un vórtex durante 30 seg. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-7} y se sembraron en placas de Agar Dextrosa Sabouraud y agar Soya-Trypticaseina para crecimiento de hongos y bacterias respectivamente. Después de 48 hrs de incubarlas en estufa a 36°C , se sembró un inóculo de la biomasa de cada cultivo en placas de CHROMagar™ *Candida*, CHROMagar™ *Staph.aureus*, CHROMagar™ *Acinetobacter* y CHROMagar™ *Orientation* mediante la técnica por agotamiento y se volvieron a incubar en la estufa. Posterior al crecimiento de las colonias se llevó a cabo el conteo de forma visual registrando el total de la placa de Agar Dextrosa Sabouraud y agar Soya-Trypticaseina que fuera nítido y tuviera mas de 30 colonias y mínimo de 300 según las normas establecidas. El detalle de los procedimientos microbiológicos y las fichas técnicas de los CHROMagar™ están incluídos en el ANEXO 4. El investigador principal y personal del laboratorio de microbiología estuvieron cegados a las asignaciones de tratamientos.

8. ASPECTOS ÉTICOS.

Se solicitó aprobación por parte del comité de Ética del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” con número de registro 93-14 con fecha del 26 de septiembre del 2014. ANEXO 5

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y hasta la enmendada en la 64ª WMA Asamblea General, Fortaleza, Brazil, Octubre 2013; y con La ley General de Salud, en materia de la investigación para la salud, que de acuerdo al artículo 3º menciona contribuirá:

- Al conocimiento de los vínculos entre las causas de enfermedad, la práctica médica y la estructura social
- A la prevención y control de los problemas de salud

De acuerdo al artículo 17º, ésta Investigación se considera de riesgo mínimo ya que las actividades a realizar son:

1. Recabar información en un formato de ficha de recolección de datos

2. Observar de forma clínica intra-oral para evaluar la presencia de lesiones de los tejidos blandos en boca.
3. Obtener una muestra por hisopado de la cavidad oral, siguiendo un método no invasivo e indoloro. Ver ANEXO 6
4. Colocar de forma tópica el gel con y sin AgNp's previa aleatorización en la cavidad oral de cada paciente, así como cerca del tubo endotraqueal, repartiendo el total con un hisopo limpio y estéril de una forma homogénea.

Todos los sujetos de estudio pertenecieron a la población de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto".

Cabe mencionar que los procedimientos a los que se sometieron los sujetos de estudio, tanto para las evaluaciones clínicas, como toma de muestras y colocación de gel con y sin nanopartículas de plata, no representaron un gasto adicional para el sujeto de estudio sobre los gastos en los que normalmente incurriría por ser admitido y/o tratado en la unidad clínica mencionada.

Siguiendo los lineamientos de los artículos 21 y 22, Se explicaron a los responsables legales de cada sujeto potencial de estudio, el propósito y naturaleza del experimento, incluyendo el tipo y procedimientos específicos para la evaluación del gel propuesto, el registro de mediciones clínicas y la identificación microbiológica a partir de muestras de la mucosa oral.

Después de haber leído, entendido y aclarado cualquier duda sobre el estudio, su participación y la forma de consentimiento informado, se le pidió al familiar responsable legal que firmara dicha forma, con lo cual estableció su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar. Ver formato en ANEXO 6

En todos los casos los sujetos podían retirarse del estudio si así lo deseaban, con simplemente comunicarlo al clínico responsable, sin que esto pueda representar algún perjuicio en el tipo, calidad o curso del tratamiento para el cual acuden y se admiten a la UTI.

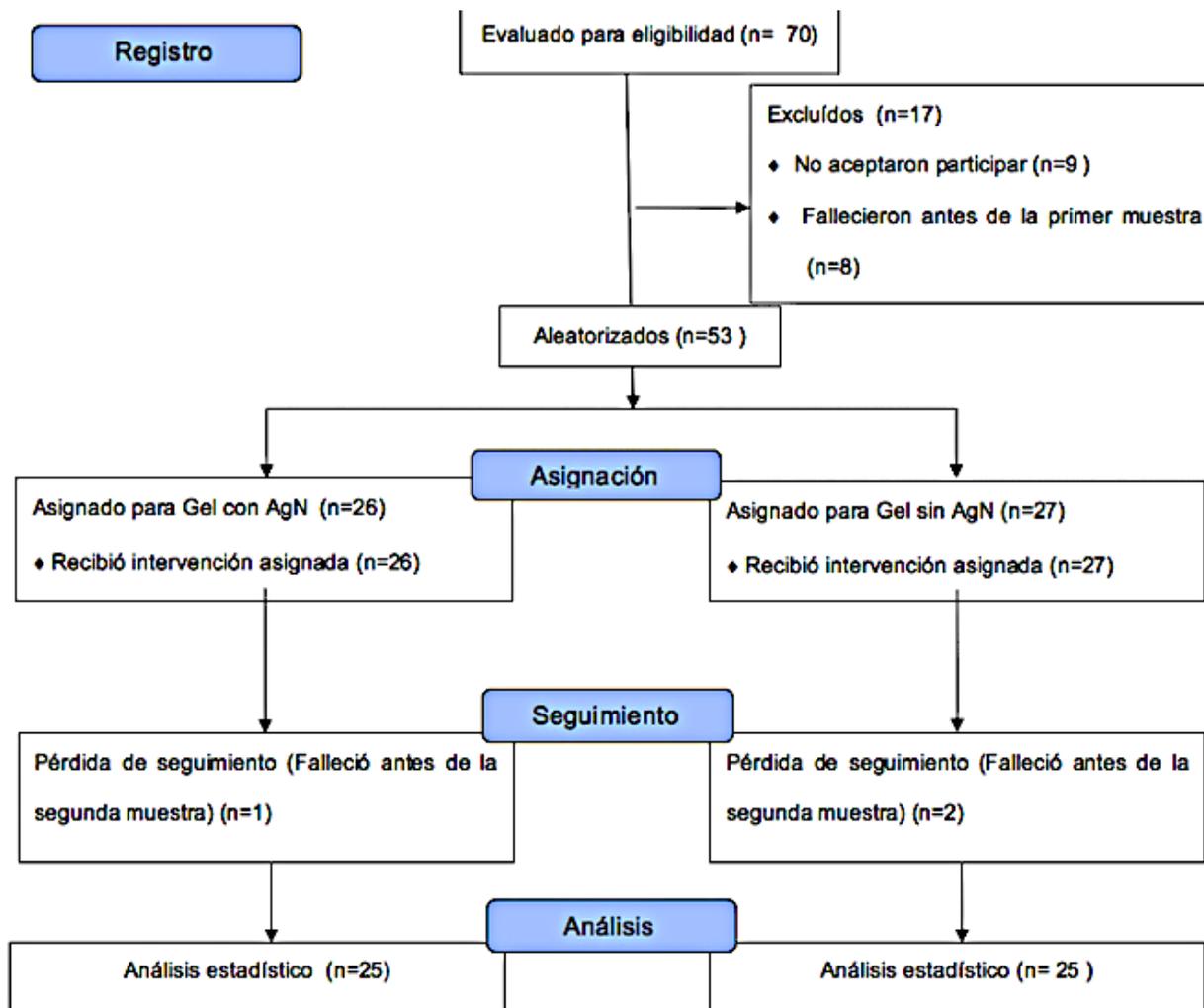
9. RESULTADOS

9.1 Asignación

Fueron estudiados un total de 70 pacientes, aleatorizados en bloques de dos para dos tratamientos. Durante el estudio, se excluyeron nueve pacientes cuyos familiares solicitaron no ser incluidos en el protocolo; 8 más que fallecieron y 3 pacientes que fueron extubados antes de tomar la segunda muestra, fueron eliminados.

La muestra total analizada incluyó 50 pacientes, 25 para tratamiento con gel dopado con AgNP's (Trtamiento A) y 25 para tratamiento con gel sin AgNP's (grupo placebo o Tratamiento B). (Diagrama 1).

Diagrama 1: Diagrama de flujo de la muestra



9.2 Características Generales de los pacientes

Entre las características generales de la población, se observó que la mayoría de los pacientes estudiados fueron del sexo masculino, con una edad media de 41.6 años DE=18.5 (15-86 años), un tiempo de intubación promedio de 54.1 hrs (DE=21.5, 24-120 hrs), así mismo presentaron un índice APACHE II promedio de 9.8 (DE=4.9, escala 1-20) y la utilización de antimicrobianos en 23(46%). (Tabla 1)

Tabla 1. Características generales de pacientes intubados en UTI por tratamiento.

		Gel con AgNP's (n=25)		Gel sin AgNP's(n=25)		n=50
Variables		Media	DE	Media	DE	p
Edad (15-86 años)		44.88	20.83	38.36	15.61	0.2*
APACHE II (0-20)		9	4.92	11	4.77	0.1*
Tiempo de intubación		58.44	23	49.92	19.5	0.2*
		n	%	n	%	p
Sexo	Masculino	15	60	18	72	0.5**
	Femenino	10	20	7	14	0.4**
Antimicrobiano	Si	12	52	11	48	0.5**
	No	13	48	14	52	0.5**

*T – student, **X² ; DE = Desviación estándar

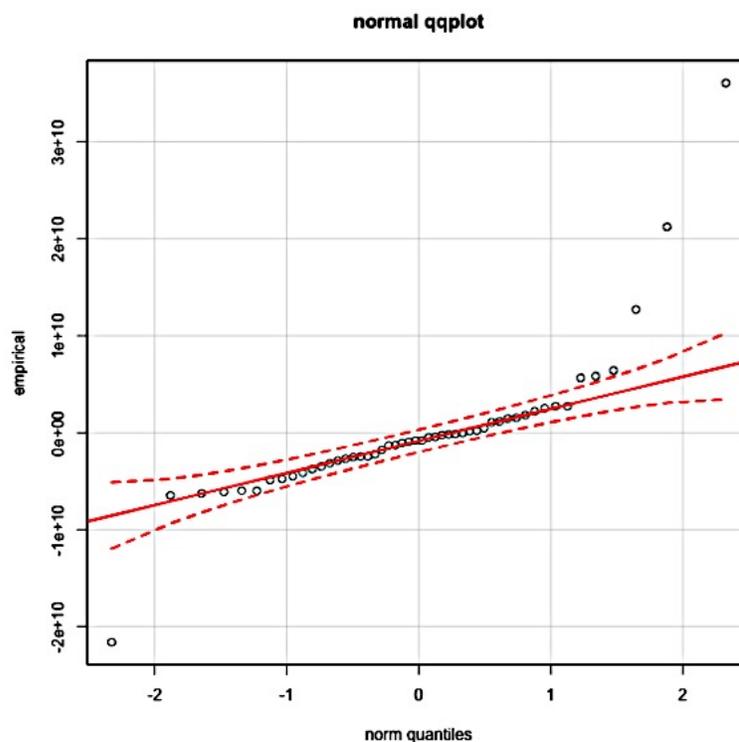
9.3 Diferencias según el modelo de regresión lineal

Con la finalidad de observar si hay diferencias significativas entre los conteos basales y finales de UFC microbianas de aislados clínicos de cavidad oral de pacientes de UTI intubados, utilizando tratamiento tópico de gel dopado con AgNP's y gel sin dopaje, y con esto, mostrar la efectividad de dicho tratamiento, se realizó un análisis con el siguiente modelo lineal al 95% nivel de confianza con el programa R; Rcmdr y Rstudio en su versión más reciente:

TOTALM2 ~ TOTALM1 + Tratamiento + TI + AM + APACHEII

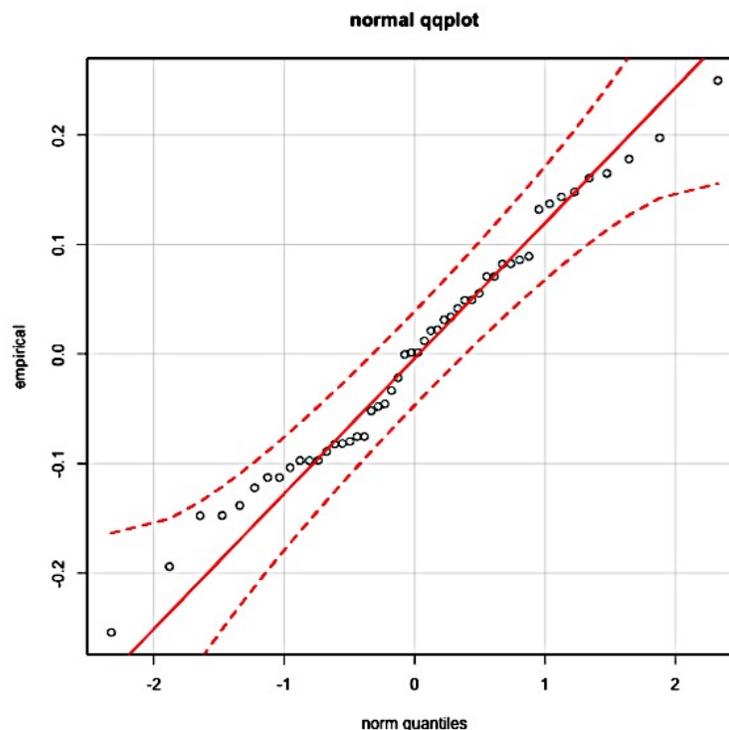
No existe evidencia de normalidad del conjunto de datos con la prueba de Shapiro-Wilk, mostrando con una $P < 0.001$ como se muestra en la Gráfica 2:

Gráfica 2. Qqplot de Prueba de Shapiro Wilk mostrando distribución no normal.



Posteriormente se realizó transformación Box-Cox de la variable independiente con la finalidad de usar pruebas paramétricas. Un nuevo análisis de normalidad con Shapiro-Wilk resultó con un valor de $p=0.7$, mostrando normalidad del conjunto de datos. Gráfica 3.

Gráfica 3. Qqplot de Prueba de Shapiro Wilk mostrando distribución normal después de transformación Box-Cox.



Se analizó el modelo $TOTALM2 \sim TOTALM1 + \text{Tratamiento} + TI + AM + APACHEII$, resultando estadísticamente significativa con una $p=0.05$. Para determinar la calidad del modelo y poder replicar los resultados, al determinar la proporción de variación de los mismos, se encontró una R^2 de 21.5% y R^2 ajustada de 12.6%, con $TOTALM2$ como variable dependiente y con el conjunto de variables independiente, así entonces el 87.6% de la variación con $TOTALM2$ no está explicada con este modelo, posteriormente se redujo el modelo hasta la variable que mostró significancia siendo:

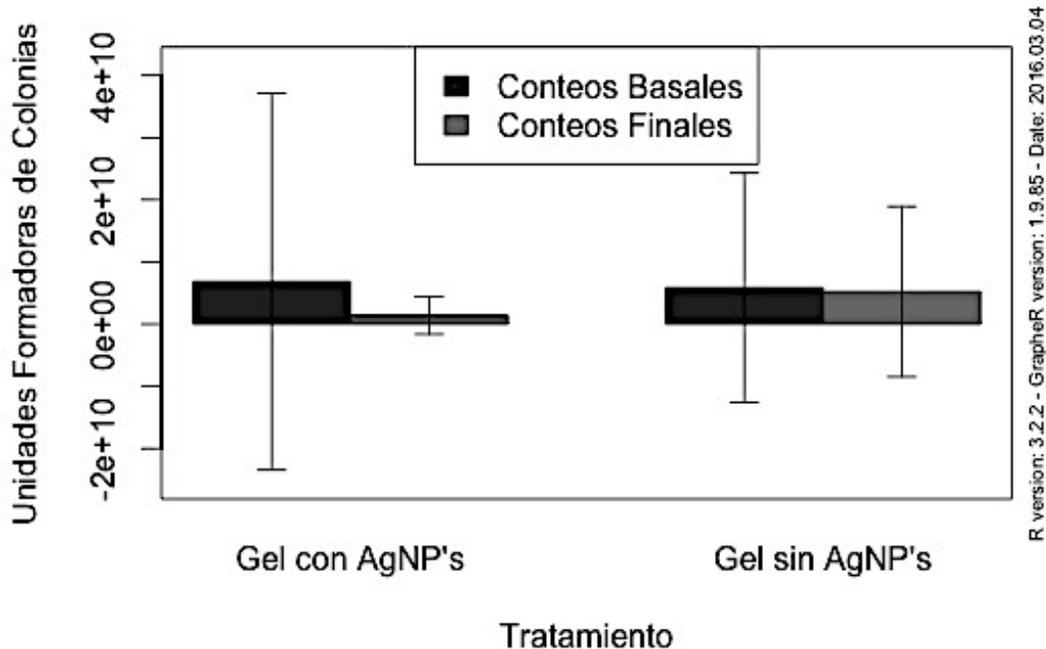
$TOTALM2 \sim TOTALM1$.

Con este modelo de regresión se muestran diferencias significativas con una R^2 1.55%, R^2 ajustada de 1.09% y con una $p=0.01$. El 98 % de la variación con $TOTALM2$ no está explicada con este modelo. Con estos resultados se puede

interpretar que existe alguna variable que disminuye el conteo final con respecto al basal que no tiene que ver con el tratamiento empleado.

Para determinar las cuentas microbianas orales totales basales en pacientes con ventilación mecánica antes de la higiene bucal y posterior al tratamiento experimental, se obtuvo el conteo de los microorganismos por ml de saliva en expresión logarítmica de UFC, comparando las medias entre grupos. La media basal de los pacientes del grupo experimental fue para el gel dopado con AgNp's o (tratamiento A) se redujo 5.431×10^9 , de 6.846×10^9 disminuyendo a 1.415×10^9 posterior al tratamiento, no mostrando diferencia estadísticamente significativa, con respecto al gel sin las AgNp's (Tratamiento B) con una $p > 0.05$. La media basal de los pacientes del grupo control (Tratamiento B) fue de 5.862×10^9 disminuyendo discretamente a 5.220×10^9 , sin diferencia significativa ($p = 0.4$; T-student). A pesar de no observar diferencia significativa entre los conteos basales vs conteos finales con tratamiento experimental o control Gráfica 4.

Gráfica 4. Gráfica de Barras mostrando diferencias entre conteos basal y final por grupo de tratamiento



Se observó una reducción en el grupo experimental. La reducción en las cuentas microbianas corresponde a una actividad inhibitoria, no observándose actividad bactericida. Ver Tabla 2

Tabla 2. Diferencias de las cuentas microbianas por grupo de tratamiento

Tratamiento	Media	DE	Media	DE	p **
Gel con AgNp's (Tratamiento A)	6.846	3.029	1.415	3.030	0.5
Gel sin AgNp's (Tratamiento B)	5.862	1.845	5.220	1.370	0.4

*Los datos están representados 1×10^9 ,

** T – student;

DE = Desviación estándar

9.4 prevalencia de microorganismo en la unidad de cuidados intensivos

En la tabla 3 se muestra la prevalencia de los patógenos identificados en la mucosa oral de los pacientes antes del tratamiento y después del tratamiento por grupo de estudio. Respecto a las especies de bacterias y hongos que colonizaron la cavidad oral de los pacientes evaluados, antes y después del tratamiento, se identificaron especies de los géneros *Candida*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* y *Acinetobacter* en ambos grupos. Se observó que posterior a la aplicación del tratamiento experimental, no se identificó *Acinetobacter* spp ni *Candida* spp en el conteo final. La frecuencia de *Enterococcus* que se mantuvo con la misma frecuencia independientemente del tratamiento aplicado. Con respecto a *C. glabrata* disminuyó considerablemente con el tratamiento A ($p=0.004$) y *Acinetobacter* spp se eliminó en el conteo final con ambos tratamientos. *C. albicans* se mantuvo sin disminución pese al tratamiento empleado. Es interesante que *Staphylococcus aureus* disminuyó de forma significativa con el placebo ($p=0.02$). Así también para *Acinetobacter baumannii* no se observó una reducción significativa ($p=0.6$) con tratamiento B y con Tratamiento A ($p=0.8$)

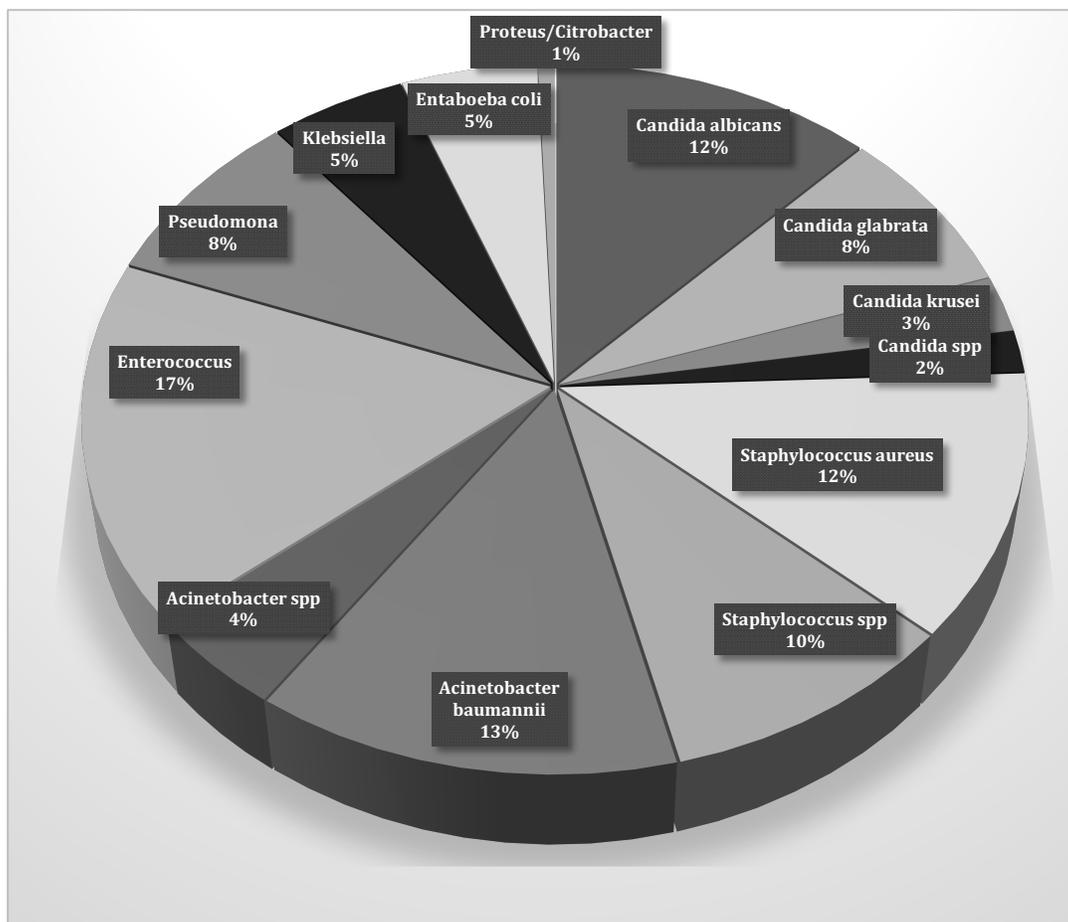
Tabla 3. Prevalencia de los patógenos identificados en la mucosa oral de los pacientes antes del tratamiento y después del tratamiento por grupo de estudio

Microorganismo	Tratamiento experimental (A)					Tratamiento placebo (B)				
	n :25					n :25				
Candida	Basal	%	Final	%	*p	Basal	%	Final	%	*p
<i>Candida albicans</i>	12	48	12	48	1	7	28	7	28	1
<i>Candida glabrata</i>	11	44	2	8	0.004	1	4	1	4	1
<i>Candida krusei</i>	3	12	2	8	0.6	1	4	2	8	0.6
<i>Candida spp</i>	1	4	0	0	NA	2	8	2	8	1
Staphylococcus										
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	48	12	48	1	7	28	1	4	0.02
<i>Staphylococcus spp</i>	10	40	8	32	0.6	5	20	5	20	1
Acinetobacter										
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	40	11	44	0.8	11	44	9	36	0.6
<i>Acinetobacter spp</i>	3	12	0	0	NA	4	16	0	0	NA
Enterobacteriaceae										
<i>Enterococcus</i>	13	52	9	36	0.3	13	52	11	44	0.6
<i>Pseudomona</i>	7	28	4	16	0.9	6	24	5	20	0.7
<i>Klebsiella</i>	6	24	5	20	0.7	2	8	3	12	0.6
<i>Entaboeba coli</i>	4	16	1	4	0.2	4	16	0	0	NA
<i>Proteus/Citrobacter</i>	1	4	2	8	0.6	0	0	1	4	NA

* χ^2

En la Gráfica 5, se muestra la prevalencia de microorganismos orales aislados de pacientes con VMA en la UTI; apreciándose que existe en primer lugar presencia de *Enterococcus faecalis* (17%), posteriormente *Acinetobacter baumannii* (13%), en tercero y cuarto lugar de prevalencia *Candida albicans* (12%) y otra especie de *Staphylococcus* (10%) siendo en mayor proporción la especie *S. Aureus* (12%). Lo que respecta a las demás especies de bacterias u hongos la disminución no fue significativa con cualquiera de los tratamientos.

Gráfica 5. Prevalencia de Microorganismos en la Unidad de Cuidados Intensivos



10 DISCUSIÓN

En el presente estudio, fue evaluada la eficacia de la aplicación de una única dosis tópica de un hidrogel dopado con AgNP's a una concentración de 12.5 µg/mL para reducir la carga microbiana oral en pacientes con VMA, comparado con el efecto de un gel sin dopar. Se determinó que el gel dopado con AgNP's redujo la carga microbiana oral 5.4 veces en comparación con el grupo placebo cuya reducción fue de 0.6 veces, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento, ya que la reducción de las UFC fue menor de 1 logaritmo. No obstante ésta reducción de las cargas microbianas demuestra la capacidad inhibitoria de las AgNP's, no así una capacidad microbicida. Jain y cols, evaluaron un gel dopado con AgNP's en el mismo lapso de tiempo que en este trabajo, ellos observaron una reducción de 3 log y proponen esta reducción para determinar la eficacia antimicrobiana de las AgNP's [59]. Cabe resaltar, que dicho estudio demostró la eficacia *in vitro*, lo que difiere con nuestras evaluaciones.

Los pacientes que se estudiaron en este trabajo eran pacientes con VMA ingresados en la UTI del Hospital Central de nuestra localidad. Para ser incluidos en el estudio se consideraron como criterios de inclusión que todos estuvieran alimentados con sonda nasogástrica, con reducida hiposalivación y nula autoclisis, además de que estuvieran en coma o coma inducido, con el fin de reducir variables en la eficacia del gel dopado con AgNP's. Por lo que la aplicación del gel se llevó a cabo de forma complementaria a los procedimientos de higiene oral recomendados por las GPDTNAV, asegurando que las AgNP's se aplicaran cada 6 a 8 hrs, coincidiendo con el siguiente procedimiento de higiene oral, intervalos señalados como eficaces bactericidas [28].

La distribución por genero y media de edad de nuestra población es similar a los reportes de trabajos similares, la población más afectada con 66 % fue la masculina y el promedio de edad fue de 41 años, a diferencia del reporte de Gil-Perotin (2012) [71] donde se reporta un 27% de mujeres con una media de edad de 59 años, mientras que otro estudio, reporta una edad promedio de 57 años [72].

Cerca del 75% de los pacientes en UTI de este trabajo, estaban ingresados en la unidad por accidentes con diversas complicaciones, muchas de ellas traumatismos craneoencefálicos, lo que coincide con los datos reportados según el perfil estatal de seguridad vial en San Luis Potosí 2013, en donde el mayor índice de mortalidad es en el sexo masculino, con una tasa de accidentes que es del 28.3 por cada 100.000 habitantes en contraste con 6.6 por cada 100,000 habitantes para mujeres. Bergmans en el 2000 [33] menciona que hasta casi el 70% de los pacientes que están hospitalizados en la UTI son del sexo masculino.

Así mismo, las condiciones sistémicas de los pacientes estudiados fueron consideradas utilizando el índice APACHE II, como un índice predictor de infecciones nosocomiales propuesto por Knaus y cols. en 2014 [73]. Este índice ha sido previamente validado evalúa la gravedad del paciente en UTI [74,75], considerando análisis clínicos, la escala de Glasgow y las enfermedades que padecen; prediciendo en base al puntaje el estado del paciente y sus posibilidades de morir. Otros estudios usaron el mismo índice con medias de 20 en puntaje, a diferencia de lo observado por nosotros donde se observaron medias en puntaje de 10, observamos al respecto que la condición sistémica no se relaciono con el aumento o reducción de la carga microbiana oral independientemente si se les aplico o no el gel dopado con AGNP's.

También según el modelo lineal realizado, las condiciones demográficas y clínicas de los pacientes estudiados y su evolución no influyeron en el efecto del tratamiento evaluado con AGNP's, sin embargo dichas condiciones de los pacientes en la UTI, son predictoras de una mayor profilefacción de MO patógenos provenientes de la microbiota oral normal, los cuales hemos planteado que por diferentes factores disbióticos elevan el riesgo de infecciones profundas y/o diseminadas. Scannapieco [29] menciona al respecto, el papel que juegan estos MO en las infecciones respiratorias y la importancia de disminuir las UFC microbianas de cavidad oral para minimizar el riesgo de padecer NAV; ya que se ha demostrado que el uso TET y su colonización por agentes microbianos orales incrementa dicho riesgo a producir esta enfermedad [76-79].

Un intento de modificar el ambiente bucal local ha sido el motivo central de este trabajo, dicha modificación se encamina a disminuir riesgos de NAV, como se ha demostrado por otros autores [17,18,78], en revisiones sistemáticas [38], meta-análisis [79-81] y guías nacionales [36] e internacionales [82,83]. El uso de antisépticos como la CHX a diferentes porcentajes aunado a las técnicas de cepillado, han demostrando su efectividad en disminuir el riesgo de enfermedades pulmonares [84,85]. Lo anterior refuerza nuestro trabajo que plantea la importancia en la reducción de la microbiota oral en pacientes con TET lo que impactará en la reducción del riesgo de NAV [70]. La eficacia de agentes antisépticos, antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos) [86] o la combinación, para disminuir el riesgo de NAV, ha sido demostrada previamente [5]. Entre las propuestas evaluadas se encuentran: a) el uso de CHX, b) técnicas mecánicas de higiene oral, c) alternativas antimicrobianas conjuntas [87], d) dispositivos recubiertos con AgNP's como TET o catéteres [88], e) AgNP's combinadas con antibióticos [89], estos últimos reportando una reducción significativa de bacterias gramnegativas.

Sin embargo, en este contexto se debe considerar que la exposición frecuente a cualquier sustancia antimicrobiana resultara en selección de cepas resistentes [90,91] y/o adquisición de mecanismos de resistencia, por lo que las AgNP's ofrecen una alternativa segura, eficaz tanto en evaluaciones *in vivo* [92,93] como *in vitro* [94] para combatir cepas resistentes.

El tiempo, uso y frecuencia de aplicación de AgNP's para reducir MO de la microbiota oral son factores a considerar para mostrar significancia clínica [95], por lo que en este trabajo se propuso su uso incorporándolas a un gel inerte con el objeto de mejorar el tiempo de contacto, sin embargo, no se observó el efecto deseado sobre las cuentas totales, por lo que planteamos que la eficacia depende de una serie de factores intrínsecos y extrínsecos revisados por Hajipour y cols [96], Ravishankar Rai y Jamuna Bai [97]. Los factores intrínsecos incluyen: concentración, tamaño, forma, tiempo de exposición.

Se han reportado concentraciones mínimas inhibitorias de las AgNP's van en un rango de 0.78-6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [64] a un rango de 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [98], evaluadas *in vitro*, sobre cepas ATCC. En el presente trabajo, utilizamos una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tomando como base reportes previos de la caracterización de AgNP's observando un efecto bajo *in vivo*, por lo que es necesario evaluar concentraciones superiores en futuros ECCA's, basados en un análisis exhaustivo necesario de la farmacocinética de las mismas que considere el tiempo de permanencia en los tejidos orales, la dinámica salival, humectabilidad de los tejidos entre otros factores, para explicar porque *in vitro* se ha demostrado una alta eficacia que no es replicable clínicamente, así como analizar otros factores influyentes sin dejar de lado la toxicidad que puedan generar.

Respecto al tamaño, se ha propuesto que las de menor tamaño muestran mayor actividad microbica, especialmente las <30 nm [99]. No obstante, si son de menor tamaño pueden ser más tóxicas para células humanas como fibroblastos o macrófagos [100]. Las usadas en este trabajo fueron de 40 a 60 nm, evaluadas previamente *in vitro* sin efectos tóxicos asociados al tamaño, pero sí dependientes de la dosis y tiempo de exposición [52,64].

Al respecto de la toxicidad de las AgNP's en consideración a su uso clínico, existe un trabajo muy interesante donde una solución comercial de AgNP's en una concentración de 10 a 32 ppm [60] ingerida, no causo cambios metabólicos, hematológicos, urinarios, ni generación de especies reactivas de oxígeno o incremento en citocinas, sin cambios morfológicos abdomen, hígado y riñón evaluados con resonancia magnética, lo cual sustenta su uso potencial en concentraciones más altas en ensayos clínicos controlados aleatorizados.

Otro factor intrínseco es la forma de las AgNP's; en este trabajo se evaluaron las de forma esférica que se ha demostrado eficaz en estudios *in vitro* [52,63,64], no obstante, Hajipour [58] menciona que la forma triangular resulta más cortante y muestra mayor actividad que la esférica, a este respecto la mayoría de los resultados

sobre su eficacia se demuestran utilizando cepas de referencia y ninguno en estudios *in vivo* o con aislados clínicos.

Respecto al vehículo, en el presente trabajo se utilizó un hidrogel inerte dopado con AgNP's, se ha planteado que los vehículos les confieren a las AgNP's un andamio ideal para su acción antimicrobiana [101], y aunque se han evaluado *in vitro* diferentes biomateriales como silicones, nanomateriales de alginato, chitosán, y adhesivos de uso odontológico, no hay evidencia suficiente de que mejoren su efecto.

Diferentes factores no considerados en este trabajo, tales como el ambiente aeróbico o anaeróbico, pH, la velocidad de crecimiento bacteriano, la actividad metabólica y su crecimiento en biopelícula, son factores extrínsecos que pudieran afectar la sensibilidad a las AgNP's [102]. Por lo que se sugiere analizar la influencia de estos para estandarizar las condiciones ideales de las AgNP's y su uso clínico. Así como la diversidad microbiana presente en la cavidad oral.

Ávila y col. en el 2009 [103], identificaron como parte de la microbiota oral normal, a bacterias que se encuentran en el tracto gastrointestinal y otras bacterias gram negativas causantes de infecciones nosocomiales de difícil manejo [103,104], todos éstos, considerados MR [105], siendo los más relevantes *Enterococcus faecalis*, seguido de *Acinetobacter baumannii*, especies de *Staphylococcus* y de éstos últimos, los de mayor proporción la especie *S. aureus*. Fue muy relevante en este trabajo que se aislaron de la mucosa bucal de los pacientes con TET, patógenos causantes de infecciones nosocomiales, los cuales no siempre forman parte de la microbiota oral normal, entre los datos más relevantes *Acinetobacter baumannii* fue aislada de la mucosa oral de nuestros pacientes estudiados, esta bacteria cuando infecta, aumenta la mortalidad de los pacientes en la UTI, inclusive Garrouste-Orgeas en 1997 [28] menciona que estando presente en la cavidad oral puede aumentar hasta 7.5 veces el riesgo de desarrollar NAVM, demostrando mediante estudios filogenéticos que las cepas aisladas causantes de neumonía eran las mismas de las

aisladas en boca [106–108]. A la fecha existen pocos reportes [109] que mencionan haber aislado *A. baumannii* en la región orofaríngea, generalmente se ha mencionado que es el mismo en aislados de sangre y que colonizan la región gastrointestinal. Por otra parte, observamos que su frecuencia no se afectó después de la aplicación de AgNP's, a diferencia del reporte de Lysakowska y cols. [110] quienes observaron un efecto bactericida *in vitro* de cepas de *A. baumannii* utilizando AgNP's a una concentración de 0.78 µg/mL.

En el trabajo de Roberto Monteiro y cols [111] evaluaron el efecto de AgNP's en concentraciones efectivas de 0.4 a 3.3 µg/ml, sobre biopelículas de *Candida albicans* y *C. glabrata*, resultando interesante que hubo disminución de éste último con el tratamiento experimental propuesto. Mientras que en otro trabajo donde evaluaron resinas para obturaciones dentales dopadas con AgNP's de 6 hasta 80 nm, observaron un efecto fungicida en contra de *Candida* [112,113], con efectos similares a la nistatina contra de *Candida albicans* y *C. glabrata* disminuyendo la estomatitis asociada a prótesis dental [114]. En un estudio realizado en Turquía por Dereli en el 2012 [22], demostraron que los principales microorganismos causante de infecciones nosocomiales son bacterias gramnegativas y especies de *Candida*; reportando cifras muy similares con Azim [115] y con el presente trabajo.

Respecto a la frecuencia de los MO estudiados, encontramos que *C. albicans* ocupó el tercer lugar de prevalencia, coincidiendo con otros trabajos que han demostrado su presencia tanto en lavados bronquiales como aislados bucales [116–118]. Esta frecuencia de colonización por *Candida*, es consistente con trabajos previos, Hedderwick (2000) [119] reporta en su estudio que 65% de los pacientes estaban colonizados en alguna parte del cuerpo por hongos al momento de su hospitalización.

Al respecto de otros patógenos, Kathleen Hutchins [6] reporta que el mayor índice de colonización en NAV de aislados traqueales lo tuvo *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*, mientras que Vandecandelaere en el 2013 [120,121] reporta que la mayoría

de las especies aisladas en garganta, nariz y setum nasal son consideradas como microorganismos farmacoresistentes.

En este trabajo aunque hubo disminución inhibitoria de UFC microbianas orales, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre usar AgNP's y no hacerlo. Sin embargo, se destaca una reducción en la frecuencia de *C. glabrata*, mientras que *Acinetobacter baumannii*, *Entecobactericeae*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. krusei* se matuvieron sin diferencias en su frecuencia después del tratamiento propuesto.

Con lo anterior podemos mencionar que los efectos observados en los trabajos *in vitro* o en modelos animales no se consideran aplicables a modelos clínicos humanos, probablemente por el desarrollo de biopelículas microbianas complejas y una alta variabilidad de especies en las cargas totales, donde la susceptibilidad antimicrobiana se ve modificada, por lo que es necesario realizar más estudios modificando dosis, tiempo de acción y/o vehículo para lograr el efecto deseado, basados en un modelo farmacocinético de predicción preciso.

No obstante el efecto inhibitorio observado sobre las cuentas totales representa un hallazgo muy importante que deberá estudiarse en mayor profundidad, evaluando el efecto sobre especies específicas.

11. CONCLUSIONES

Un hidrogel inerte dopado con AgNP's en una concentración de 12.5 µg/mL reduce las cuentas microbianas orales totales 9 veces más que un hidrogel sin dopar, lo que demuestra su efecto antimicrobiano, sin demostrarse una eficacia ya que la reducción de las cuentas no alcanza significancia clínica en la reducción logarítmica alcanzada (<1 Log), no obstante, se reduce significativamente la frecuencia de *C. glabrata*, no así la de otros microorganismos incluyendo *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. krusei* los cuales se mantienen presentes después de aplicar el hidrogel dopado con AgNP's y se reducen las cuentas totales en un rango de actividad inhibitoria.

12. REFERENCIAS

1. Breathnach AS. Nosocomial infections and infection control. *Medicine*; 2013;41(11):649–53.
2. László I, Trásy D, Molnár Z, Fazakas J. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. *J Immunol Res*. 2015;510436.
3. Daly CG, Mitchell DH, Highfield JE, Grossberg DE, Stewart D. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol*. 2001;72(2):210–4.
4. Komiya K, Ishii H, Kadota J-I. Healthcare-associated Pneumonia and Aspiration Pneumonia. *Aging Dis*. 2015;6(1):27–37.
5. Pileggi C, Bianco A, Flotta D, Nobile CG, Pavia M. Prevention of ventilator-associated pneumonia, mortality and all intensive care unit acquired infections by topically applied antimicrobial or antiseptic agents: a meta-analysis of randomized controlled trials in intensive care units. *Crit Care* 2011;15(3):R155.
6. Hutchins K, Karras G, Erwin J, Sullivan KL. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. *Am J Infect Control*. 2009;37(7):590–7.
7. Vandecandelaere I, Matthijs N, Nelis HJ, Depuydt P, Coenye T. The presence of antibiotic-resistant nosocomial pathogens in endotracheal tube biofilms and corresponding surveillance cultures. *Pathog Dis*. 2013;69(2):142–8.
8. Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Goolam Mahomed A. The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J*. 1999;13(3):546–51.
9. Hraiech S, Alingrin J, Dizier S, Brunet J, Forel J-M, La Scola. Time to intubation is associated with outcome in patients with community-acquired pneumonia. *PloS One*. 2013;8(9):e74937.
10. Weber DJ, Sickbert-Bennett EE, Brown V, Rutala WA. Completeness of Surveillance Data Reported by the National Healthcare Safety Network: An Analysis of Healthcare-Associated Infections Ascertained in a Tertiary Care Hospital, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33(01):94–6.
11. López-Herrera JR, Méndez-Cano AF, Bobadilla-Espinosa RI, Zacate-Palacios

J. Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc.* 2012;20(2):85–90.

12. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(1):1–14.

13. Martínez-Reséndez MF, Garza-González E, Mendoza-Olazarán S, Herrera-Guerra A, Rodríguez-López JM, Pérez-Rodríguez E. Impact of daily chlorhexidine baths and hand hygiene compliance on nosocomial infection rates in critically ill patients. *Am J Infect Control.* 2014;42(7):713-717.

14. Li H-Y, Li S-J, Yang N, Hu W-L. Evaluation of nosocomial infection risk using APACHE II scores in the neurological intensive care unit. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2014;21(8):1409–12.

15. Waters M, Nightingale P, Edwards JD. A critical study of the APACHE II scoring system using earlier data collection. *Arch Emerg Med.* 1990;7(1):16–20.

16. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13(12):589–95.

17. Fourrier F, Cau-Pottier E, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Jourdain M, Chopin C. Effects of dental plaque antiseptic decontamination on bacterial colonization and nosocomial infections in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2000;26(9):1239–47.

18. Fourrier F, Dubois D, Pronnier P, Herbecq P, Leroy O, Desmettre T. Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med.* 2005;33(8):1728–35.

19. Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol.* 2013;40(8):771–80.

20. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010;89(1):8–18.

21. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am.* 2008;29(11):996–1011.
22. Dereli N, Ozayar E, Degerli S, Sahin S, Koç F. Three-year evaluation of nosocomial infection rates of the ICU. *Braz J Anesthesiol.* 2013;63(1):73–78.
23. Infecciones nosocomiales en un hospital de alta especialidad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2005; 43(5):381-391
24. Molina-Gamboa JD, Garza-Moreno H. Vigilancia de infecciones nosocomiales en un hospital de cardiología. *Salud Publica Mex.* 1999;41:suppl1:S26-S31.
25. Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008;47(2):e17–24.
26. Heo S-M, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008;47(12):1562–70.
27. Heo S-M, Sung RS, Scannapieco FA, Haase EM. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *J Oral Microbiol.* 2011;3(6362):1-10.
28. Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet G, Marie O, Rouveau M, Popoff N. Oropharyngeal or Gastric Colonization and Nosocomial Pneumonia in Adult Intensive Care Unit Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(5):1647–55.
29. Scannapieco FA. Role of Oral Bacteria in Respiratory Infection. *J Periodontol.* 1999;70(7):793–802.
30. Wiencek C, Winkelman C. Chronic critical illness: prevalence, profile, and pathophysiology. *AACN Adv Crit Care.* 2010;21(1):44–61.
31. Díaz LA, Llauradó M, Rello J, Restrepo MI. [Non-pharmacological prevention

- of ventilator-associated pneumonia]. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(4):188–95.
32. Coppadoro A, Berra L, Bigatello LM. Modifying endotracheal tubes to prevent ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(2):157–62.
 33. Bergmans DC, Bonten MJ, Gaillard CA, Paling JC, van der Geest S, van Tiel FH, et al. Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):382–8.
 34. Berry AM, Davidson PM, Nicholson L, Pasqualotto C, Rolls K. Consensus based clinical guideline for oral hygiene in the critically ill. *Intensive Crit Care Nurs Off J Br Assoc Crit Care Nurses*. 2011;27(4):180–5.
 35. DOF (Diario Oficial de la Federación). NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.
 36. Secretaría de Salud. Guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica. CENETEC Mexico; 2013.
 37. Maldonado-Ortiz A, Niederman MS, Arancibia Hernández F, Osorio J, Regalado Pineda J, Sereno B, et al. Informe de la conferencia de Consenso Interamericana sobre Neumonía Nosocomial y Asociada a la Ventilación Mecánica. *Rev Inst Nac Enfermedades Respir* 2005;18(4):298–307.
 38. O'Reilly M. Oral care of the critically ill: a review of the literature and guidelines for practice. *Aust Crit Care*. 2003;16(3):101–10.
 39. Shi Z, Xie H, Wang P, Zhang Q, Wu Y, Chen E, et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;8:CD008367.
 40. Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, et al. *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. *Eur J Oral Sci*. 2013;121(3 Pt 1):162–8.
 41. Lachapelle J-M. A comparison of the irritant and allergenic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol*. 2014;24(1):3–9.
 42. Zolfaghari PS, Wyncoll DL. The tracheal tube: gateway to ventilator-associated

pneumonia. *Crit Care*. 2011;15(5):310.

43. Palmore TN, Henderson DK. Testing the tube: assessing silver as a potential “silver bullet” for preventing ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2010;38(4):1220–1.

44. Kollef MH, Afessa B, Anzueto A, et al. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: The nascent randomized trial. *JAMA*. 2008;300(7):805–13.

45. Rello J, Afessa B, Anzueto A, Arroliga AC, Olson ME, Restrepo MI, et al. Activity of a silver-coated endotracheal tube in preclinical models of ventilator-associated pneumonia and a study after extubation. *Crit Care Med*. 2010;38(4):1135–40.

46. Rello J, Kollef M, Diaz E, Sandiumenge A, del Castillo Y, Corbella X, et al. Reduced burden of bacterial airway colonization with a novel silver-coated endotracheal tube in a randomized multiple-center feasibility study. *Crit Care Med*. 2006;34(11):2766–72.

47. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns J Int Soc Burn Inj*. 2000;26(2):117–30.

48. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns J Int Soc Burn Inj*. 2000;26(2):131–8.

49. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1818–25.

50. Edwards-Jones V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(2):147–52.

51. Zhang T, Song Y-J, Zhang X-Y, Wu J-Y. Synthesis of silver nanostructures by multistep methods. *Sensors*. 2014;14(4):5860–89.

52. Hernández-Sierra JF, Galicia-Cruz O, Angélica SA, Ruiz F, Pierdant-Pérez M, Pozos-Guillén AJ. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on human periodontal fibroblasts. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;36(1):37–41.

53. Hwang I, Lee J, Hwang JH, Kim K-J, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012;279(7):1327–38.

54. Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;79(1):5–18.
55. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm*. 2009;6(5):1388–401.
56. Bachler G, von Goetz N, Hungerbühler K. A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3365–82.
57. Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, van der Ha D, Verstraete W, et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84(4):741–9.
58. Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IR de, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 2012;30(10):499–511.
59. García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J*. 2011;61(6):297–301.
60. Munger MA, Radwanski P, Hadlock GC, Stoddard G, Shaaban A, Falconer J, et al. In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2014;10(1):1–9.
61. Ruiz F, Hernández Sierra J H, Pierdant Pérez M, Mandeville P, Salas Lopéz E. Efecto de las nanopartículas de plata adicionadas al sellador de fasetas y fisuras en la prevención de la caries dental. [Facultad de Medicina]: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2011.
62. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DCC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén A de JP. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2008;4(3):237–40.
63. Martinez MJM, Benavides PR, Bocanegra RJG, Ruiz F, Vazquez DAG, Martinez CGA. Process for manufacture of nanometric, monodisperse, and stable

metallic silver and product obtained therefrom 2008. [Google Patents]

64. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Vanden Hoek A. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012;8(3):328–36.

65. Norma Oficial Mexicana NOM-134-ssa1-1995, que establece las especificaciones sanitarias de los tubos endotraqueales, de plástico, grado médico con marca radiopaca, esteriles, desechables, con globo de alto volumen y baja presión, con orificio: tipo Murphy y sin globo tipo Magill.

66. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol*. 1996;49(12):1373–9.

67. Peduzzi P, Concato J, Feinstein AR, Holford TR. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol*. 1995;48(12):1503–10.

68. Box GEP, Cox DR. An Analysis of Transformations. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 1964;26(2):211–52.

69. Revelle, W. (2015) psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, Version = 1.5.8.

70. Scannapieco FA, Yu J, Raghavendran K, Vacanti A, Owens SI, Wood K. A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. *Crit Care Lond Engl*. 2009;13(4):R117.

71. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. *Crit Care Lond Engl*. 2012;16(3):R93.

72. Pneumatikos IA, Dragoumanis CK, Bouros DE. Ventilator-associated pneumonia or endotracheal tube-associated pneumonia? An approach to the pathogenesis and preventive strategies emphasizing the importance of endotracheal tube. *Anesthesiology*. 2009;110(3):673–80.

73. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13(10):818–29.

74. Li H, Li S, Yang N, Hu W. Evaluation of nosocomial infection risk using APACHE II scores in the neurological intensive care unit. *J Clin Neurosci*. 2014;21(8):1409-12
75. Niewiński G, Starczewska M, Kański A. Prognostic scoring systems for mortality in intensive care units--the APACHE model. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2014;46(1):46–9.
76. Gentile MA, Siobal MS. Are specialized endotracheal tubes and heat-and-moisture exchangers cost-effective in preventing ventilator associated pneumonia? *Respir Care*. 2010;55(2):184–96; discussion 196–7.
77. Zilberberg MD, Shorr AF. Ventilator-associated pneumonia as a model for approaching cost-effectiveness and infection prevention in the ICU. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(4):385–9.
78. Koeman M, van der Ven AJAM, Hak E, Joore HCA, Kaasjager K, de Smet AGA. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(12):1348–55.
79. Pineda LA, Saliba RG, El Solh AA. Effect of oral decontamination with chlorhexidine on the incidence of nosocomial pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care*. 2006;10(1):R35.
80. Wang J, Liu K, Ariani F, Tao L, Zhang J, Qu J-M. Probiotics for Preventing Ventilator-Associated Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis of High-Quality Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE*. 2013;8(12).
81. Chan EY, Ruest A, Meade MO, Cook DJ. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2007;334(7599):889.
82. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control*. 1997;46(RR-1):1–79.
83. Carvajal C, Pobo A, Díaz E, Lisboa T, Llauradó M, Rello J. Oral hygiene with chlorhexidine on the prevention of ventilator-associated pneumonia in intubated patients: a systematic review of randomized clinical trials. *Med Clínica*. 2010;135(11):491–7.

84. Beraldo CC, Andrade D de. Oral hygiene with chlorhexidine in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *J Bras Pneumol Publicação Of Soc Bras Pneumol E Tisiologia*. 2008;34(9):707–14.
85. Rafii F, Sutherland JB, Cerniglia CE. Effects of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(6):1343–58.
86. Gu W-J, Gong Y-Z, Pan L, Ni Y-X, Liu J-C. Impact of oral care with versus without toothbrushing on the prevention of ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Lond Engl*. 2012;16(5):R190.
87. Pacheco-Fowler V, Gaonkar T, Wyer PC, Modak S. Antiseptic impregnated endotracheal tubes for the prevention of bacterial colonization. *J Hosp Infect*. 2004;57(2):170–4.
88. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2010;6(1):103–9.
89. Safari M, Saidijam M, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. High Prevalence of Multidrug Resistance and Metallo-beta-lactamase (M β L) producing *Acinetobacter Baumannii* Isolated from Patients in ICU Wards, Hamadan, Iran. *J Res Health Sci*. 2013;13(2):162–7.
90. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Bonfanti C, Manca N. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in an Italian hospital. *J Infect Public Health*. 2013;6(3):179–85.
91. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res*. 2010;89(11):1175–86.
92. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2007;2:129–36.
93. Lara HH, Ayala-Nunez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:615–21.
94. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the

antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(4):662–8.

95. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76–83.

96. Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012;8(6):916–24.

97. Mukha IP, Eremenko AM, Smirnova NP, Mikhienkova AI, Korchak GI, Gorchev VF. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2013;49(2):215–23.

98. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279–90.

99. Martínez-Gutiérrez F, Guajardo-Pacheco JM, Noriega-Trevino ME, Thi EP, Reiner N, Orrantia E. Antimicrobial activity, cytotoxicity and inflammatory response of novel plastics embedded with silver nanoparticles. *Future Microbiol*. 2013;8(3):403–11.

100. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Hoek AV. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012;8(3):328–36.

101. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(15):1638–49.

102. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009;28(8):405–11.

103. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):665–70.

104. Heo S-M, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008;47(12):1562–

70.

105. Delfino D, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Galbo R, David A. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. noviembre de 2014;20(11):O946–51.

106. Heo S-M, Sung RS, Scannapieco FA, Haase EM. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *J Oral Microbiol*. 2011;3:1–10.

107. Łysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Klimek L, Sienkiewicz M. The activity of silver nanoparticles (Axonnite) on clinical and environmental strains of *Acinetobacter* spp. *Burns J Int Soc Burn Inj*. marzo de 2015;41(2):364–71.

108. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol*. 2012;54(5):383–91.

109. Elguezabal N, Maza J, Ponton J. Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis*. 2004;10(2):81–6.

110. Lino MM, Paulo CSO, Vale AC, Vaz MF, Ferreira LS. Antifungal activity of dental resins containing amphotericin B-conjugated nanoparticles. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. 2013;29(10):e252–62.

111. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses*. 2013 Nov;56(6):672-80.

112. Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia AK, Singh RK, Prasad KN. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum beta-lactamase- and metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria--an Indian experience. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 8):955–60.

113. Caggiano G, Puntillo F, Coretti C, Giglio M, Alicino I, Manca F, et al. *Candida*

- colonization index in patients admitted to an ICU. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):7038–47.
114. Charles PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. *Intensive Care Med.* 2005;31(3):393–400.
115. Darwazeh AM-G, Hammad MM, Al-Jamaei AA. The relationship between oral hygiene and oral colonization with *Candida* species in healthy adult subjects*. *Int J Dent Hyg.* 2010;8(2):128–33.
116. Hedderwick SA, Lyons MJ, Liu M, Vazquez JA, Kauffman CA. Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2000;19(9):663–70.
117. Vandecandelaere I, Matthijs N, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P, De Bus L. Assessment of Microbial Diversity in Biofilms Recovered from Endotracheal Tubes Using Culture Dependent and Independent Approaches. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e38401.

ANEXO 1. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOSNo de ficha: **I. DATOS GENERALES**Fecha de estudio: Turno: Número de cama: Clave de quien llenó ficha:

Llenado Obligatorio según códigos que se encuentran en la parte posterior

II. Datos del paciente			
Numero de expediente		Edad	
Tiempo de intubación		Sexo	
Uso de antimicrobianos		Antimicrobianos	
APACHE II			
Tratamiento	A		
	B		
Complicaciones			
		Enfermedades	

Edad	Continuo
Sexo	M y F (1 o 0)
Numero de cama	Numero
Horas de intubación	Continuo
Intubación en los 30 días previos	Si o no (1 o 0)
Uso de antimicrobianos(Var)	Si o no
Antimicrobianos	códigos
Enfermedades	Códigos de enfermedades. (diabetes, hipertensión, cirrosis, enf. Renal, síndrome metabólico, cardiopatía, otras.
APACHE II (Var)	0 a 71

ANEXO 2. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS



POTENTIAL CLINICAL RELEVANCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
8 (2012) 328–336



Research Article

nanomedjournal.com

Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles

Fidel Martínez-Gutierrez, MSc^{a,b,c}, Emily P. Thi, BSc^a, Judith M. Silverman, PhD^a,
Carolina Camargo de Oliveira, PhD^a, Sarah L. Svensson, BSc^d, Amanda Vanden Hoek, BSc^{e,f},
Elpidio Morales Sánchez, PhD^g, Neil E. Reiner, MD^a, Erin C. Gaynor, PhD^d,
Edward L.G. Pryzdial, PhD^{e,f}, Edward M. Conway, MD, PhD^{e,h}, Erasmo Orrantia, PhD^c,
Facundo Ruiz, PhD^b, Yossef Av-Gay, PhD^a, Horacio Bach, PhD^{a,*}

^aDepartment of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

^bFacultad de Ciencias Químicas, UASLP, Álvaro Obregón 64, San Luis Potosí, México

^cCentro de Investigaciones de Materiales Avanzados, Chihuahua, México

^dDepartment of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

^eCentre for Blood Research, University of British Columbia, Canadian Blood Services, Vancouver, BC, Canada

^fDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

^gDepartamento de Físico Matemáticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

^hDepartment of Medicine, Division of Haematology-Oncology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada

Received 1 November 2010; accepted 18 June 2011

En esta revisión el equipo de trabajo del Dr Facundo Ruiz, de la Facultad de ciencias químicas muestran como se obtienen las nanopartículas y las pruebas correspondientes para demostrar que se pueden usar en humanos de forma segura.

Síntesis de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNp's) se sintetizaron mediante la disolución de 0,0169 g de AgNp'sO₃ en 100 ml de agua desionizada y esta solución se colocó en un recipiente de reacción de 250 ml. Se disolvió un total de 0,01 g de ácido gálico en 10 ml de agua desionizada y bajo agitación mAgNp'sética se añadió a la solución de AgNp'sO₃. Después de la adición de ácido gálico, el valor pH de la solución se ajustó inmediatamente a 10 usando una solución de 7,7 M de NH₄OH. El pH de la solución que contiene los AGNP'SPS se cambió ligeramente por debajo de 7 con HNO₃, se filtró a través de filtro de vacío Millipore (100 nm de diámetro) y se lavó con 25 ml de agua desionizada. El pH se aumentó a 7 y las AgNp's se volvieron a dispersar en agua antes de su caracterización.

Caracterización de los AgNp's

Las AgNp's producidas se caracterizaron por espectroscopia utilizando un UV-Vis S2000 UV-Vis de OceanOptics Inc., (Dunedin, Florida). El análisis DLS se realizó en

un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), utilizando agua como disolvente. El análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un JEOL JEM-1230 (JEOL, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 100 kV. Todos los análisis de caracterización se realizaron utilizando las dispersiones acuosas obtenidas de AgNp's. Para determinar si los AgNp's eran estables a las concentraciones utilizadas en este estudio (5 y 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$), se realizó un estudio de estabilidad utilizando AgNp's y el medio RPMI utilizado para las células de mamíferos de cultivo. El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta se midieron mediante DLS y los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 experimentos independientes.

La micrografía TEM reveló que los AgNp's son monodispersas y de forma esférica. Con base en el histograma de distribución de tamaño de partícula evaluado a partir de la micrografía TEM correspondiente ($n = 157$), el tamaño medio (\pm SD) de PN se calculó como $24,4 \pm 9$ nm. El diámetro hidrodinámico (\pm SD) de la AgNp'sP sintetizado fue de $27,1 \pm 2,3$ nm con una distribución de potencial zeta de $-43,5 \pm 7,57$ mV, medido por dispersión dinámica de luz (DLS) ($n = 1,42 \times 10^{15}$ PN / ml). Los resultados de la ensayo de estabilidad muestran que las AgNp's a las concentraciones ensayadas eran estables en medio de cultivo celular, ya que el tamaño hidrodinámico se aumentó a $49,6 \pm 18,2$ N min de alta concentración, con una distribución de potencial zeta de $-20,6 \pm 6,9$ mV

Citotoxicidad de AgNp's en células THP-1

Se cultivaron células THP-1 a una densidad de 1×10^6 en medio RPMI completo en placas de 24 pocillos después de la administración de suplementos de PMA como se describe en otros trabajos y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada suplementada con 5% de CO_2 durante 18 horas. Al día siguiente, el PMA se ha retirado y 1 ml de RPMI que contienen 8 concentraciones AgNp's diferentes que oscilan entre 0,5 a $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ se añadió a las células THP-1 activadas por PMA (en lo sucesivo denominadas macrófagos). Los macrófagos tratados durante 6 horas con peróxido de hidrógeno al 5% se utilizaron como control positivo, y las células no tratadas se utilizaron como un control negativo. Después de 24 horas, las células se lavaron con 800 ml de medio RPMI por agitación a 100 rpm durante 10 minutos ($\times 2$).

Las células se trataron con tripsina posteriormente con 1 ml de 0,025% de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, California) durante 15 minutos. Posteriormente, 200 ml de cada suspensión celular se transfirió a una placa de 96 pocillos y la citotoxicidad de los PN se midió por tinción de los macrófagos con yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich). La emisión de PI se detectó a 610 a 625 nm utilizando la puerta de FL3 de un clasificador de células tipo BD FACS Vantage SE Turbo (BD, Mississauga, Ontario, Canadá).

La exposición de Nanopartículas de plata en los macrófagos, muestra un efecto citotóxico dependiente de la dosis. Las AgNp's de 40 a 60 nm a concentraciones de hasta 6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de exposiciones muestran únicos efectos citotóxicos mínimos resultando en $20,5 \pm 1,7\%$ de muerte, frente a $11,5 \pm 1,3\%$ de muerte celular en el control negativo. Sin embargo, las concentraciones superiores a 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ causaron la muerte significativa de macrófagos de aproximadamente el 50%. No se observaron efectos importantes sobre el unidades formadoras de colonias de células progenitoras óseas derivadas de médula hematopoyéticas humanos cuando estas células fueron expuestas a nanopartículas de plata de (90-210 nm) a concentraciones de 5, 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.³³ Tampoco hubo efectos en células de fibroblastos NIH3T3 tratados con ANan (1-100 nm) en concentraciones de hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

ANEXO 3.FICHA TÉCNICA K – Y

Ampliamente seguro pues se usa entre otros para intubar a los pacientes, colocación de sondas nasogástricas, en estudios de imagen como ultrasonido, lubricación genital, etc. Los componentes son: Agua, glicerina, propilenglicol, hidroxietilcelulosa, fosfato de sodio monobásico, metilparabeno, fosfato de sodio dibásico, propilparabeno. La presentación que se usó en este protocolo es un tubo de 100 mg

K-Y®

Gel lubricante



**(Glicerina,
propilenglicol,
hidroxietilcelulosa)**

PRESENTACIONES: Tubos de 50 y 100 g.

Para mayor información del producto, comuníquese al teléfono 01 800 LLAMA JJ (55 26255).

íco,

JANSSEN-CILAG, S.A. DE C.V.

Fabricado y exportado por:

Johnson & Johnson Industrial Ltda.

Importado por:

Johnson & Johnson Personal Care (Chile), S.A.

Importado y distribuido por:

Johnson & Johnson De México, S. A. de C. V.

Reg. Núm. 0765C2009, SSA

ANEXO 4 MONTAJE DE LOS MÉTODOS CLÍNICOS Y DE MUESTREO DEL PILOTO

Para el montaje de los métodos clínicos y de muestreo, el investigador principal acudió a la Unidad de Hospitalización de hombres y mujeres, realizando la toma de muestra de pacientes que estuvieron a cargo del Departamento de Geriatría, así como también a la consulta externa los días asignados al mismo departamento. Acudió además a la Unidad de Cuidados Intensivos para conocer al personal médico y de enfermería, el manejo de las áreas, los momentos de intervención, así como familiarizarse con el manejo del protocolo señalado en *la guía de práctica clínica: Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica* [33] que se sigue en el HC "DIMP", y se dió a conocer el ensayo propuesto al personal de la UTI.

Con la lista de aleatorización obtenida, se llenaron con un mL en medio estéril jeringas hipodérmicas de 3 ml con gel correspondiente para su aplicación. Otro miembro del equipo de trabajo quien estuvo cegado a la intervención clínica, colocó las jeringas con el gel dopado con AgNp's y gel sin ellas en la caja de unicel para transportar tanto muestras como tratamiento. Ambas jeringas muestran que tanto el gel con y sin AgNp's son idénticos en apariencia y tan solo le colocó número de paciente asignado previa aleatorización de tratamiento que le correspondía.

Estudio piloto externo

Se realizó un estudio piloto externo que permitió establecer parámetros iniciales de las UFC obtenidas y probables diferencias entre sujetos hospitalizados y de la comunidad, así como se estandarizó el montaje de los métodos clínicos de muestreo, el manejo, transporte y procesamiento microbiológico antes de iniciar el ensayo clínico; es decir, que en esta primera etapa no se colocó ninguna condición experimental. Los resultados permitieron optimizar los métodos y establecer pautas de las frecuencias esperadas. Este ensayo piloto incluyó 20 pacientes.

ANEXO 5. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DE MUESTRA DEL PACIENTE

Material por paciente

- 1 Campo estéril
- 1 Hisopo estéril para muestra basal y otro para muestra final
- 1 Abate lenguas estéril
- 1 Par de guantes desechables
- 1 Cubre bocas
- 1 Lentes de protección
- 1 Gorro desechable
- 1 Bata desechable
- 1 Base de unicel para tubos falcón
- 1 Tubo falcón para transportar la muestra basal y otro para muestra final
- 1 Bolsa para desechos
- 1 Hielera unicel
- 1 Tijeras
- 1 Frasco con atomizador con loción alcoholica sanitizante

Metodología

1. Colocar mesa para Base de unicel para tubos falcón, hisopo, barreras de protección y demás material.
2. Lavarse las manos y sanitizarlas con alcohol al 75%
3. Colocarse barreras de protección.
4. Cubrir la mesa con el campo estéril.

5. Vaciar material estéril sobre campo, y colocarlo de forma ordenada (abate-lenguas, hisopos, tubo falcón).
6. Llevar a cabo un hisopado iniciando por el cuadrante 1, frotando tanto mucosa gingival, superficies dentales vestibulares, palatinas/linguales, oclusales, repitiendo la misma técnica en los 4 cuadrantes siguiendo el orden con respecto al avance de las manecillas del reloj, hecho esto pasar a la zona del paladar tomando una muestra a ambos lados (izquierdo y derecho) y por ultimo pasar al piso de la boca y lengua en sus caras dorsal, ventral y bordes laterales.
7. Transportar ese hisopo hasta el tubo falcón, cortando el excedente del palillo de este, para poder cerrar el tubo correctamente.
8. Cerrar herméticamente el tubo y llevarlo a la base de muestras.
9. Colocar en la bolsa roja los desechos bio-contaminados.
10. Recolectar todas las muestras en la hielera para su transporte al laboratorio de bioquímica, patología y microbiología.

Se sugiere que la toma de muestra se realice a la misma hora para todos los pacientes, previa a la higiene oral rutinaria por parte del hospital, y una última a las 12 hrs posteriores a la colocacion del tratamiento; además de las medidas antisépticas según los lineamientos y guías para el control, prevención y tratamiento de la neumonía asociada a ventilación mecánica que se sigue en la Unidad de Cuidados Intensivos.

ANEXO 6 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Metodología para identificación y conteo de Unidades Formadoras de Colonias microbianas totales y de *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae*. Obtenidas de la cavidad oral de los pacientes que cumplan los criterios de inclusión

De un mililitro de cada muestra se sembrarán 100 μL (dilución 10^3) para conteo total de Unidades Formadoras de Colonias microbianas en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para identificación de hongos y AgarSoya Triptasa (AST) para bacterias. También por separado *cada una de las muestras será sembrada por diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-3}* y se obtendrán 100 μL las cuales serán sembradas en placas de cultivo de CHROMagar™ Staph aureus, CHROMagar™ Candida, CHROMagar™ Acinetobacter Base, CHROMagar™ Orientation y Agar Difco™ MacConkey. Las placas de cultivo serán incubadas a $36^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 hrs.

Cada 24 horas será verificado el crecimiento en las placas registrando número, tamaño, color y textura de las colonias, para este fin se utilizará una cámara cuenta-colonias.

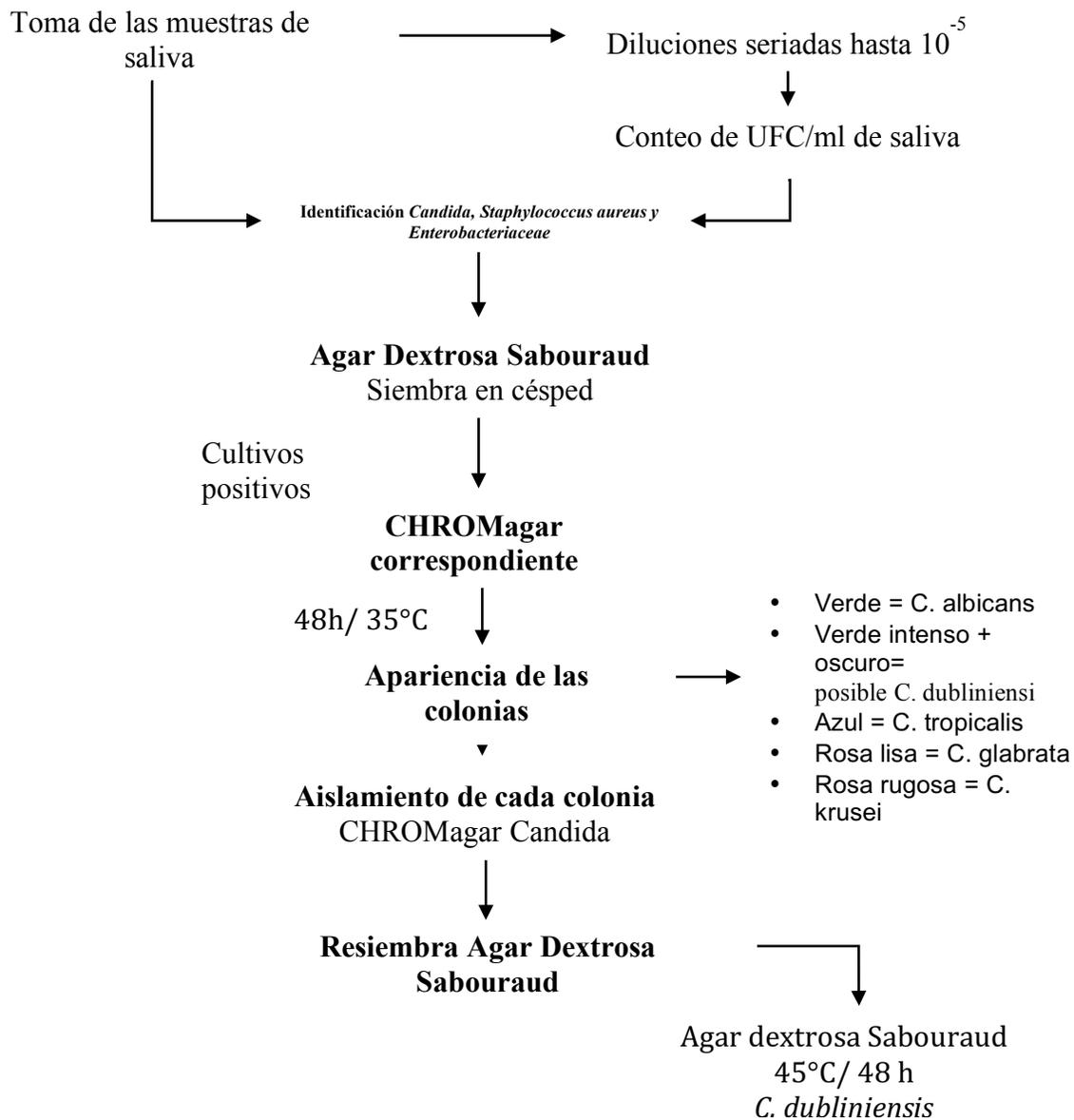
En los casos que resultaron positivos la identificación de los microorganismos de interés se realizó utilizando medios selectivos diferenciales y la identificación microscópica de las colonias.

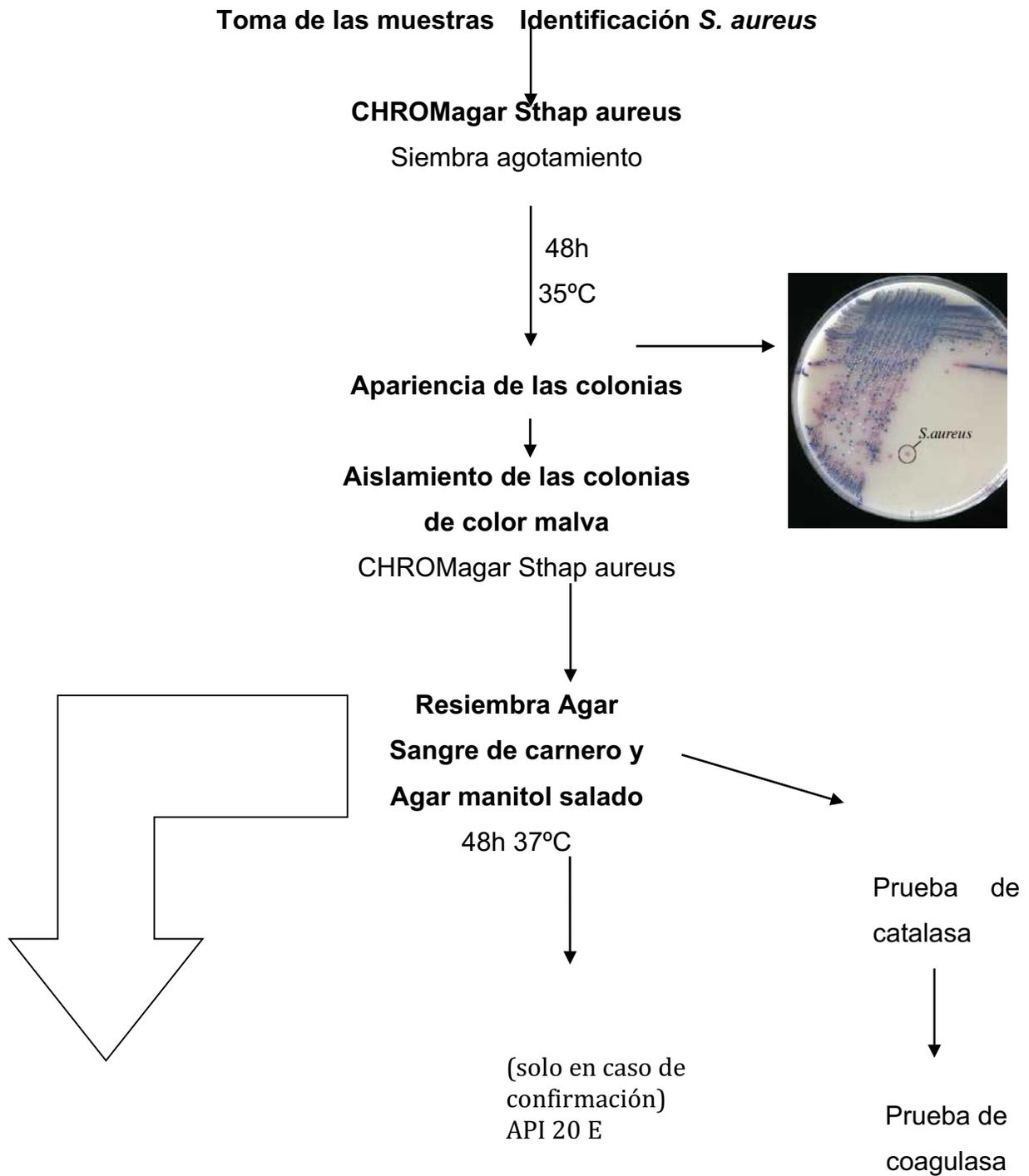
Para el caso de los casos positivos en agar Dextrosa Sabouraud, de aquella placa con el mayor crecimiento se tomará un inóculo picando al azar 10 colonias o áreas de la placa, este inóculo será resembrado por la técnica de cultivo puro para lograr el aislamiento de colonias en placas de CHOMAgar Candida® y serán incubadas a $36^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 hrs. Adicionalmente se realizará un frotis, tinción de gram y la identificación microscópica de los microorganismos desarrollados

Para el caso de los casos positivos en agar manitol Salado, de aquella placa con el mayor crecimiento se tomará un inóculo picando al azar 10 colonias o áreas de la placa, este inóculo será resembrado por la técnica de cultivo puro para lograr el aislamiento de colonias en placas de CHROMAgar Staph aureus® y serán

incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 hrs. Adicionalmente se realizará un frotis, tinción de gram y la identificación microscópica de los microorganismos desarrollados. Para el caso de los casos positivos en agar Soya-Trypticaseína, de aquella placa con el mayor crecimiento se tomará un inóculo picando al azar 10 colonias o áreas de la placa, este inóculo será resembrado por la técnica de cultivo puro para lograr el aislamiento de colonias en placas de *Agar MacConkey* y *Agar EMB* y serán incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 hrs. Adicionalmente se realizará un frotis, tinción de gram y la identificación microscópica de los microorganismos desarrollados.

A continuación se presenta un diagrama de los métodos a emplear:





Asimilación de Carbohidratos

CHROMagar™ Candida

Instrucciones de uso

ESPAÑOL

Instrucciones de uso

FINALIDAD DEL MEDIO

Medio cromogénico para la detección de *Candida* spp.

En la mayoría de casos, las especies de *Candida* causan infecciones superficiales orofaríngeas y urogenitales. "El diagnóstico precoz es esencial para el control efectivo de los pacientes". Directrices de la OMS sobre procedimientos operativos estándar para el diagnóstico de laboratorio de infecciones oportunistas en VIH).

Aunque *C. albicans* es la principal especie implicada, otros tipos como *C. tropicalis*, *C. krusei* o *C. glabrata* aumentan su presencia proporcionalmente al tiempo que los nuevos agentes antifúngicos actúan muy eficazmente contra *C. albicans*.

COMPOSICIÓN

El producto se compone de una base en polvo.

Producto	=	Pack
Total g/l		47,7 g/l
Composición g/l		Agar 15,0 Peptona 10,2 Cloramfenicol 0,5 Mezcla cromogénica 22,0
Aspecto		Forma en polvo
ALMACENAMIENTO		15-30 °C
pH FINAL DEL MEDIO		6,1 +/- 0,2

PREPARACIÓN (Cálculo para 1 l)

Paso 1 Preparación de la mezcla	<ul style="list-style-type: none"> Suspender lentamente 47,7 g de base de polvo en 1 l de agua purificada. Remover hasta que el agar haya espesado bien. Calentar hasta la ebullición (100 °C) agitando o removiendo regularmente. <p>NO CALENTAR A MÁS DE 100 °C. NO AUTOCLAVAR A 121 °C. Advertencia 1: Si utiliza un autoclave, hágalo sin presión. Consejo 1: En el paso de calentamiento a 100 °C, la mezcla también puede llevarse a ebullición en un horno microondas: tras la ebullición inicial, retirar del horno, remover suavemente, y devolver al horno para aplicar breves y reiteradas sesiones de calentamiento brusco hasta lograr la fusión completa de los granos de agar (grandes burbujas sustituirán a la espuma).</p>
Paso 2 Vertido	<ul style="list-style-type: none"> Enfriar en una cubeta térmica a 45-50°C, agitando o removiendo suavemente. Verter el medio en placas de Petri estériles. Dejar solidificar y secar.
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar en la oscuridad antes de usar. Las placas preparadas con medio pueden conservarse durante un día a temperatura ambiente. Las placas pueden almacenarse hasta dos meses refrigeradas (2/8 °C) si se han preparado correctamente y se protegen de la luz y la deshidratación.

INOCULACIÓN

Las muestras relacionadas pueden ser procesadas mediante siembra directa en la placa.

- Si la placa de agar ha sido refrigerada, dejar que caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.
- Sembrar la muestra por estrías en la placa.
- Incubar en condiciones aerobias a 30-37 °C durante 48 horas.

Muestras típicas

p. ej., muestras de piel, esputo, orina, vaginales

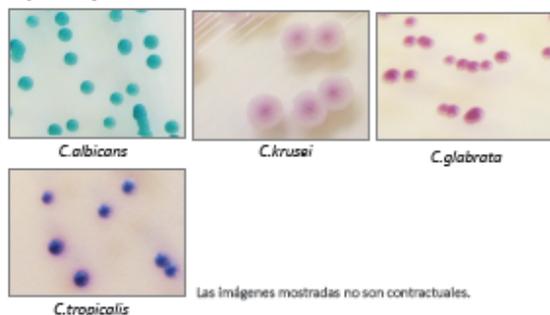
Siembra directa en estrías o en extensión

CHROMagar™ Candida

INTERPRETACIÓN

Microorganismo	Aspecto típico de las colonias
<i>C.albicans</i>	→ verde
<i>C.tropicalis</i>	→ azul metálico
<i>C.krusei</i>	→ rosa, rizadas
<i>C.kefyr, C.glabrata</i>	→ de malva a marrón
Otras especies	→ de blanco a malva

Aspecto típico de las colonias



RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

- La identificación definitiva requiere pruebas adicionales.
- La especificidad y la sensibilidad para *C.albicans*, *C.tropicalis* y *C.krusei* superan el 99% (Odds y Bernaerts 1994).

CONTROL DE CALIDAD

Realizar el control de calidad de acuerdo con la utilización del medio y los reglamentos y normas locales para QC.

La correcta preparación del medio puede analizarse aislando las cepas ATCC que se enumeran más abajo:

Microorganismo	Aspecto típico de las colonias
<i>C.krusei</i> ATCC® 14243	→ rosa y rizadas
<i>C.albicans</i> ATCC® 60193	→ verde
<i>C.tropicalis</i> ATCC® 1369	→ azul metálico
<i>C.glabrata</i> ATCC® 2001	→ malva
<i>E.coli</i> ATCC® 25922	→ inhibidas

PRECAUCIONES

- No utilice placas que muestren cualquier evidencia de contaminación o cualquier otro signo de deterioro.
- No utilizar el producto más allá de su fecha de caducidad o si el producto muestra cualquier evidencia de contaminación o cualquier otro signo de deterioro.
- Uso previsto para diagnóstico *in vitro*. Este producto de laboratorio debe ser utilizado exclusivamente por personal cualificado conforme a las buenas prácticas de laboratorio.
- Cualquier cambio o modificación en el procedimiento puede afectar a los resultados.
- Cualquier cambio o modificación de la temperatura de almacenamiento requerida puede afectar al rendimiento del producto.
- Un almacenamiento inadecuado puede afectar la vida útil del producto.
- Volver a tapar herméticamente los frascos / viales después de cada preparación y mantenerlos en un ambiente de baja humedad, protegido de la condensación y la luz.
- Para una buena detección microbiana: la recogida y transporte de las muestras deberán realizarse y adaptarse a cada muestra concreta de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

ELIMINACIÓN DE DESECHOS

Después de su uso, todas las placas y el resto de material contaminado deben esterilizarse o eliminarse mediante procedimientos internos apropiados y de acuerdo con las normativas locales. Las placas pueden destruirse mediante autoclavado a 121 °C durante al menos 20 minutos.

REFERENCIAS

Consulte nuestra página web "Publicaciones" para acceder a las publicaciones científicas sobre este producto en particular.

Enlace web: <http://www.chromagar.com/publication.php>

ÍNDICE DE LAS INSTRUCCIONES / ETIQUETA

- Cantidad de polvo suficiente para X litros de medio
- Fecha de caducidad
- Temperatura de almacenamiento requerida
- Guardar protegido de la humedad

Tamaño del envase	Referencias para pedidos	Peso
1000 ml = 50 pruebas de 20 ml	CA220	Peso: 47,7 gr
5000 ml = 250 pruebas de 20 ml	CA222	Peso: 238,5 gr
25 l = 1250 pruebas de 20 ml	CA223-25	Peso: 1192,5 gr
10 kg = 10450 pruebas de 20 ml	CA223-10kg	Peso: 10kg

¿Necesita algún documento técnico?

Disponible para su descarga en www.CHROMagar.com

- Certificado de análisis (CoA) -> Uno por lote
- Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS)

CHROMagar™ y Rambach™ son marcas comerciales creadas por el Dr. A. Rambach
ATCC® es una marca registrada de la American Type Culture Collection
NT-EXT-001 V7 / SPA 25-Nov-13

CHROMagar
The Chromogenic Media Pioneer

CHROMagar 4 place du 18 juin 1940
75006 Paris - Francia
Correo electrónico: CHROMagar@CHROMagar.com
Tel.: +33 (0)1.45.48.05.06. Sitio web: www.CHROMagar.com



CHROMagar™ Staph.aureus

FINALIDAD DEL MEDIO

Medio cromogénico para el aislamiento y diferenciación directa de *Staphylococcus aureus* en muestras clínicas e industriales.

Industria alimentaria: El hombre es el principal reservorio de *S. aureus*. Los portadores contaminan el medio ambiente circundante al toser, estornudar y al tocar la comida con la mano si esta tiene una lesión infectada con estafilococo. A menudo se encuentra en el ambiente y en las superficies de preparación de alimentos, además de en ciertos alimentos crudos (lácteos, ensaladas, sándwiches, etc.). Es importante comprobar la presencia de *S. aureus* antes y después del proceso de esterilización de los productos alimenticios.

Importancia clínica: *S. aureus* es la principal causa de infecciones de la piel y los tejidos blandos, y también puede causar infecciones graves, como infecciones del torrente sanguíneo, neumonía o infecciones óseas y articulares.

COMPOSICIÓN

El producto se compone de un único medio en polvo.

Producto	=	Pack
Total g/l		82,5 g/l
Composición g/l		Agar 15,0 Extracto de peptonas y levadura 40,0 Sales 25,0 Mezcla cromogénica 2,5
Aspecto		Forma en polvo
ALMACENAMIENTO		15/30°C
pH FINAL DEL MEDIO		6,9 +/- 0,2

PREPARACIÓN (Cálculo para 1l)

Paso 1 Preparación	<ul style="list-style-type: none"> Suspender lentamente 82,5 g de base de polvo en 1 l de agua purificada. Remover hasta que el agar haya espesado bien. Calentar hasta la ebullición (100 °C) agitando o removiendo regularmente. <p>NO CALENTAR A MÁS DE 100 °C. NO AUTOCLAVAR A 121 °C.</p> <p>Advertencia 1: Si utiliza un autoclave, hágalo sin presión.</p> <p>Consejo 1: En el paso de calentamiento a 100 °C, la mezcla también puede llevarse a ebullición en un horno microondas: tras la ebullición inicial, retirar del horno, remover suavemente, y devolver al horno para aplicar breves y reiteradas sesiones de calentamiento brusco hasta lograr la fusión completa de los granos de agar (grandes burbujas sustituirán a la espuma).</p>
Paso 2 Vertido	<ul style="list-style-type: none"> Enfriar en una cubeta térmica a 45-50 °C. Agitar o remover suavemente hasta homogeneizar. Verter el medio en placas de Petri estériles. Dejar solidificar y secar.
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar en la oscuridad antes de usar. Las placas preparadas con medio pueden conservarse durante un día a temperatura ambiente. Las placas pueden almacenarse hasta un mes refrigeradas (2/8 °C) si se han preparado correctamente y se protegen de la luz y la deshidratación.

INOCULACIÓN

Las muestras relacionadas pueden ser procesadas mediante siembra directa en la placa.

- Si la placa de agar ha sido refrigerada, dejar que caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.
- Sembrar la muestra por estrías en la placa
- Incubar a 37 °C durante 18-24 h en condiciones aerobias.

Muestras típicas

p. ej., clínica:
heridas, esputo
Industrial: Productos
alimenticios

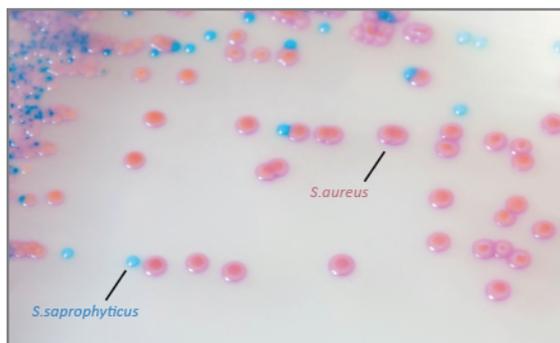
Siembra directa en estrías
o en extensión

CHROMagar™ Staph aureus

INTERPRETACIÓN

Microorganismo	Aspecto típico de las colonias
<i>S.aureus</i>	→ rosa a malva
Otras bacterias	→ inhibido, incoloro, azul

Aspecto **típico** de las colonias



Las imágenes mostradas no son contractuales.

RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

• Para el *S.aureus*, la sensibilidad es del 95,5% y la especificidad es del 99,4% (Gaillot y cols. 2000).

Nota: Si está centrado en la detección directa de cepas de MRSA, puede realizarla usando nuestro medio selectivo CHROMagar™ MRSA.

• La identificación definitiva debe hacerse mediante pruebas bioquímicas y/o de aglutinación complementarias.

CONTROL DE CALIDAD

Realizar el control de calidad de acuerdo con la utilización del medio y los reglamentos y normas locales para QC.

La correcta preparación del medio puede analizarse aislando las cepas ATCC que se enumeran más abajo:

Microorganismo	Aspecto típico de las colonias
<i>S.aureus</i> ATCC® 25923	→ malva
<i>S.saprophyticus</i> ATCC® 15305	→ azul turquesa
<i>E.coli</i> ATCC® 25922	→ inhibidas
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231	→ inhibidas
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	→ inhibidas

Instrucciones de uso

PRECAUCIONES

- No utilice placas que muestren cualquier evidencia de contaminación o cualquier otro signo de deterioro.
- No utilizar el producto más allá de su fecha de caducidad o si el producto muestra cualquier evidencia de contaminación o cualquier otro signo de deterioro.
- Uso previsto para diagnóstico *in vitro*. Este producto de laboratorio debe ser utilizado exclusivamente por personal cualificado conforme a las buenas prácticas de laboratorio.
- Cualquier cambio o modificación en el procedimiento puede afectar a los resultados.
- Cualquier cambio o modificación de la temperatura de almacenamiento requerida puede afectar al rendimiento del producto.
- Un almacenamiento inadecuado puede afectar la vida útil del producto.
- Volver a tapar herméticamente los frascos después de cada preparación y mantenerlos en un ambiente de baja humedad, protegido de la condensación y la luz.
- Para una buena detección microbiana: la recogida y transporte de las muestras deberán realizarse y adaptarse a cada muestra concreta de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

ELIMINACIÓN DE DESECHOS

Después de su uso, todas las placas y el resto de material contaminado deben esterilizarse o eliminarse mediante procedimientos internos apropiados y de acuerdo con las normativas locales. Las placas pueden destruirse mediante autoclavado a 121 °C durante al menos 20 minutos.

REFERENCIAS

Consulte nuestra página web "Publicaciones" para acceder a las publicaciones científicas sobre este producto en particular. Enlace web: <http://www.chromagar.com/publication.php>

ÍNDICE DE LAS INSTRUCCIONES / ETIQUETA

- Cantidad de polvo suficiente para X litros de medio
- Fecha de caducidad
- Temperatura de almacenamiento requerida
- Guardar protegido de la humedad

Tamaño del envase

1000 ml

50 pruebas de 20 ml
250 pruebas de 20 ml

Referencias para pedidos

TA670

Peso: 82,5 gr

5000 ml

TA672

Peso: 412,5 gr

¿Necesita algún documento técnico?

Disponible para su descarga en www.CHROMagar.com

• Certificado de análisis (CoA) --> Uno por lote

• Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS)

CHROMagar™ y Rambach™ son marcas comerciales creadas por el Dr. A. Rambach
ATCC® es una marca registrada de la American Type Culture Collection
NT-EXT-005 V8 / SPA 25-Nov-13

CHROMagar
The Chromogenic Media Pioneer

CHROMagar 4 place du 18 juin 1940
75006 París - Francia
Correo electrónico: CHROMagar@CHROMagar.com
Tel.: +33 (0)1.45.48.05.05. Sitio web: www.CHROMagar.com

IVD

CE

CHROMagar™ Acinetobacter

www.CHROMagar.com

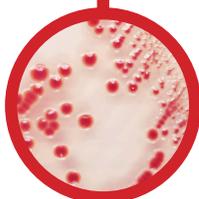


Lectura de placa

- *Acinetobacter*
→ roja
- Otras gram (-)
→ inhibidas en su mayor parte
- Bacterias gram(+) y levaduras
→ inhibidas

Para la detección de *Acinetobacter* RMF (utilizando el suplemento opcional CR102)

- *Acinetobacter* RMF
→ rojas
- *Acinetobacter* no RMF
→ inhibidas
- Otras gram (-)
→ en su mayor parte inhibidas
- Bacterias gram(+) y levaduras
→ inhibidas



Cepas de Control de calidad

Acinetobacter baumannii ATCC® 19606 roja
Acinetobacter calcoaceticus ATCC® 51432 roja
E. faecalis ATCC® 29212 inhibida
C. tropicalis ATCC® 1369 inhibida

Utilizando el suplemento CR102:

Acinetobacter baumannii ATCC® 19606 inhibida

ATCC® es una marca registrada de la American Type Culture Collection

Para la detección de *Acinetobacter* y *Acinetobacter* RMF (resistentes a múltiples fármacos)

Antecedentes

Bacteria común ampliamente extendida en la naturaleza, el *Acinetobacter* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes tanto húmedos como secos. Se convierte en un foco de infección en el entorno hospitalario, colonizando equipos médicos, la piel humana y, a veces, productos alimenticios. Las especies de *Acinetobacter* no son patógenas de manera general en personas sanas, pero son potencialmente mortales en pacientes comprometidos. A menudo se detecta en infecciones nosocomiales, unidades de cuidados intensivos, y puede, por ejemplo, causar neumonía nosocomial, bacteriemia y meningitis.

El *Acinetobacter baumannii* se está convirtiendo en un grave problema de infección adquirida en hospitales por su frecuente resistencia a múltiples fármacos (RMF: resistencia a C3G, quinolonas, carbapenem, etc.) Esto contribuye al aumento de la morbilidad y la mortalidad. Es necesaria una vigilancia activa para controlar su propagación en las instalaciones hospitalarias, reducir el riesgo de contaminación cruzada, e identificar a los portadores. La rápida identificación de pacientes colonizados con *Acinetobacter* llevaría a prácticas de control de infecciones enfocadas a prevenir la propagación de los microorganismos.

Rendimiento del medio

1 **Un único color rojo:** La detección de *A.baumannii* utilizando medios de cultivo tradicionales puede ser una tarea difícil y tediosa dada la abundancia de flora de fondo encontrada en las muestras recogidas, especialmente cuando se utilizan medios de cultivo basados en la diferenciación por la capacidad de fermentación de lactosa / no lactosa. Para superar estas dificultades se diseñó CHROMagar Acinetobacter como un medio altamente selectivo que permite el crecimiento de *Acinetobacter* en colonias de un intenso color rojo, tras sólo una noche de incubación.

2 **PRIMER medio cromogénico para la detección de *Acinetobacter*.**

3 **Control de *Acinetobacter* RMF:** Este medio puede suplementarse para ampliar la especificidad de RMF permitiendo el crecimiento de cepas resistentes a los carbapenems.

Descripción del medio

Base en polvo	Total 32.8 g/L Agar 15.0 Peptona y extracto de levadura 12.0 Sales 4.0 Mezcla cromogénica 1.8 Almacenamiento a 15/30°C - pH: 7.0 +/-0.2 Vida útil.....2 años
+ Suplemento (incluido en el envase)	Factores de regulación y crecimiento 4ml/L Almacenamiento a 15/30°C Aspecto: en líquido Vida útil..... 2 años
+ Suplemento CHROMagar MDR : CR102 Uso opcional	Mezcla selectiva.....5 dosis (1 dosis por cada 1000ml de medio final) Almacenamiento a 2/8°C Vida útil.....2 años

Muestras habituales	heces, orina, heridas
Procedimiento	Siembra directa. Incubación 18-24h a 37°C Condiciones aeróbicas
Publicaciones científicas sobre este producto disponibles en www.CHROMagar.com Por favor lea cuidadosamente las instrucciones de uso (documento IFU) disponibles en www.CHROMagar.com	

Información para hacer pedidos

Gracias por utilizar las siguientes referencias al consultar a su distribuidor :

Envase de 5000ml.....AC092

Producto = AC092(B) base en polvo + AC092(S) suplemento + suplemento CR102

Fabricante: CHROMagar
4 place du 18 juin 1940 75006 Paris - France
Email: CHROMagar@CHROMagar.com
Sitio web: www.CHROMagar.com
Encuentre su distribuidor más cercano en:
www.CHROMagar.com/contact

ANEXO 7. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

SAN LUIS POTOSÍ
Un Gobierno para Todos
GOBIERNO DEL ESTADO 2008-2010

Dr. Ignacio Morones Prieto

Dr. Javier Araujo Meléndez
Investigador principal

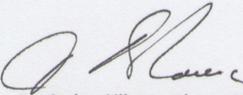
Por este conducto se le comunica que el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación de esta Institución, *revisaron y aprobaron* su protocolo de estudio clínico denominado:

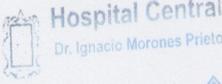
“Eficacia antimicrobiana de una formulación de nanopartículas de plata en gel para reducir la carga microbiana oral de potencial patógeno en pacientes intubados ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Central de San Luis Potosí. ECCA ADD-ON”.

El número de registro es: **93- 14**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a este comité.

De igual forma, pido sea tan amable de comunicarnos la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

Atentamente,


Dr. Carlos Gilberto Alonso Rivera
Presidente
Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación
Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”


Hospital Central
Dr. Ignacio Morones Prieto
26 SET. 2014


**COMITE DE ETICA
EN INVESTIGACION**
SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

C.C.P. Archivo

ANEXO 8 CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

Proyecto: Eficacia antiséptica de nanopartículas de plata dopadas en gel para reducir la carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica. ECCA De acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki adoptada por la 18a Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y hasta la enmendada en la 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, Octubre 2013; y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se considera como riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21 y 22:

- I. Se me informa que mi familiar cumple con requisitos de inclusión para este proyecto de investigación y se me propone que el paciente participe en dicho proyecto cuyo objetivo es estudiar la eficacia de las nanopartículas de plata añadidas a un gel no tóxico tópico, buscando que sirva como antiséptico y así contribuir a las maniobras de las Unidades de cuidados intensivos (UTI's), previamente descritos en la literatura; para poder disminuir las cuentas microbianas y con esto eliminar este factor de riesgo de producir infecciones nosocomiales (por hospitalización), específicamente la Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica.
- II. Se me ha informado que se tomarán muestras con hisopo de saliva inmediatamente al ser incluido en el estudio y posterior a la aplicación del gel que corresponda, para poder determinar la cantidad de microorganismos medidos en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) basales y posteriores a la aplicación del gel.
- III. Se me informó de la libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, así como el compromiso de notificar esta decisión a los responsables del proyecto sin que por ello se creen prejuicios para continuar el cuidado del paciente y tratamientos que se requieran parte del médico o del hospital para su afección por la cual está hospitalizado.
- IV. Se me ha informado que se llevará a cabo un proceso de aleatorización, (al azar) pudiéndole administrar Gel adicionado con nanopartículas de plata o gel sin adición de éstas, no modificando los cuidados que ya de forma rutinaria se realizan en los pacientes en condiciones críticas.
- V. Se me informa que los procedimientos que se llevaran a cabo no ponen en riesgo la vida de mi paciente, pues se ha demostrado en estudios previos que la aplicación de los componentes a estudiar en este protocolo son totalmente inofensivos, puesto que la aplicación de las dosis propuestas no generan daño toxico .
- VI. Se me ha explicado que el tratamiento a evaluar, si se aplicara a grandes dosis, podría causar argiria (pigmentación oscura irreversible por los iones de metal usado), pero que en este caso es mínimo el riesgo a que suceda dado las dosis tan bajas que se utilizarán.
- VII. Se me ha preguntado si el paciente es alérgico a cualquiera de los ingredientes que contiene el tratamiento a investigar, a lo cual respondo que no se conoce riesgo alguno.
- VIII. Se me ha informado que la aplicación del gel adicionado con o sin nanopartículas de plata no significa un gasto para mi o mi paciente, y que los gastos de éste serán sufragados por el programa de apoyo a la investigación (PIFI), en el cual ni mi paciente, ni yo, ni el hospital tenemos nada que ver.
- IX. Se me ha garantizado recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración; y que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y la participación del paciente.
- X. Se me asegura la seguridad de que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad, autorizando en su caso la

publicación científica de los resultados de forma profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad o la del paciente.

- XI. Se me informa del compromiso de proporcionarme información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar mi voluntad para permitir que continúe participando mi paciente.
- XII. Se me asegura que los datos obtenidos de la toma de muestra se le proporcionarán al medico tratante para que se incluyan en el expediente.
- XIII. En caso de se presenten eventos negativos o suficiente evidencia de efectos que no justifiquen continuar con el estudio, se informará oportunamente aunque esto represente el retiro prematuro de la investigación

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a la participación del paciente en el proyecto, yo _____(familiar y/o representante legal), autorizo que el paciente _____ con número de expediente _____ participe en el estudio.

Firma de quien autoriza

(La firma puede ser sustituida por huella digital en los casos que así lo ameriten)

Nombre, y firma del testigo 1

Nombre, y firma del testigo 2

Dirección y Relación que guarda con el paciente

Dirección y Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador que aplica el consentimiento informado

Para preguntas y/o comentarios comunicarse con el Dr. Francisco Javier Tejeda Nava, Investigador del proyecto, al (444)135-6699

ANEXO 9. CARTA DE NO CONFLICTO DE INTERESES

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Medicina/Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

Eficacia antiséptica de nanopartículas de plata dopadas en gel para reducir la carga microbiana oral en pacientes con ventilación mecánica. ECCA

Declaro bajo protesta de decir verdad que durante el tiempo que me encuentre desarrollando el proyecto previamente mencionado, me comprometo en todo momento a actuar bajo los más estrictos principios de la ética profesional, para lo cual me apegaré a lo siguiente:

En el desarrollo de mis funciones tendré acceso a cierta información perteneciente a temas científicos y académicos relacionados con el ámbito del proyecto anteriormente nombrado. En este sentido, declaro que:

No tengo ninguna situación de conflicto de interés real, potencial o evidente, incluyendo ningún interés financiero, personal, familiar o de otro tipo en, y (u) otra relación con un tercero, que:

- Pueda tener un interés comercial atribuido en obtener el acceso a cualquier información confidencial obtenida durante el trabajo de investigación al que fui invitado a participar;
- Hago constar que me conduzco por los principios generales de legalidad, honradez, lealtad, eficiencia, imparcialidad, independencia, integridad, confidencialidad y competencia técnica. El cumplimiento de estos principios garantiza la adecuada emisión de mi opinión técnica y ética solicitada;

Declaro que no estoy sujeto a ninguna influencia directa por parte de algunos de los miembros participantes ya sean coautores o colaboradores, ni mucho menos tengo compromiso de ninguna índole con las casas comerciales que se mencionan a lo largo del protocolo. En todo momento me conduciré con responsabilidad, honestidad y profesionalismo en el desarrollo de mis actos.

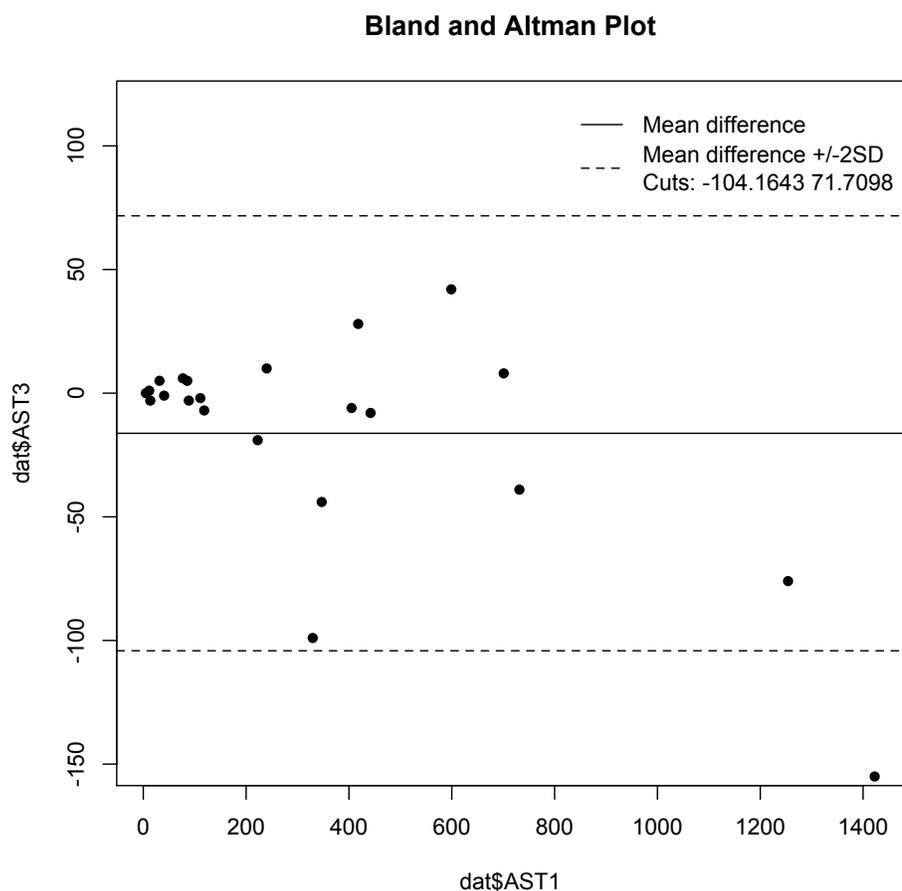
Por la presente acepto y estoy de acuerdo con las condiciones y provisiones contenidas en este documento, a sabiendas de las responsabilidades legales en las que pudiera incurrir por un mal manejo y desempeño en la honestidad y profesionalismo en el desarrollo de mi trabajo.

Nombre y Firma

ANEXO 10 CALIBRACIÓN INTRACLASE

La fase preliminar de este trabajo incluyó la calibración del observador, para ello se realizó una correlación intraclase según Bland y Altman que se llevó a cabo utilizando una base de datos con los conteos por duplicado con 22 observaciones y conteos de UFC en placas de AST (Agar Soya-Tripticaseína), obteniendo una correlación intraclase del 99% ($\pm 2SD$) dando un total del 98%.

Gráfica 5. Coeficiente de correlación intraclase



ANEXO 11. MODELAJE PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CÓDIGOS PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó variable de salida (conteo final = TOTALM2) y la variable de respuesta (conteo basal = TOTALM1) y demás variables explicativas que son importantes para determinar la eficacia de las AgNp's. Todo el análisis fue realizado con R versión 3.2.1 (2015-06-18) "World-Famous Astronaut"(69) y R Commander Version 2.1-7 al nivel de confianza del 95%(70).

Dado que la variable de respuesta fue conteos y que las variables explicativas fueron categóricas y continuas, se realizó análisis con modelos lineales y se realizó transformación logarítmica, de acuerdo a lo establecido por Peduzzi et al. Se estableció modelo lineal con 5 variables explicativas. Las variables numéricas categóricas fueron convertidas a factores. Se realizó transformación logarítmica de la variable de salida TOTALM2 y la variable de respuesta TOTALM1 para observación gráfica, aunque se dejaron las variables sin transformación para la obtención de delta(d) quedando la base de datos con 42 columnas y 50 filas. También se realizó análisis correspondiente con el comando Missing, encontrándose 0% datos perdidos. El modelo inicial fue:

$$\text{TOTALM2} \sim \text{TOTALM1} + \text{Tratamiento} + \text{TI} + \text{APACHE II} + \text{AM}$$

Se efectuó simplificación del modelo con una serie de pruebas de razón de verosimilitud eliminando la variable con la mayor probabilidad de no ser significativa hasta buscar que todas las variables pudieran ser significativas usando prueba de ANOVA de tipo II, y función para obtener valor de inflación (VIF) observando que las variables no tuvieran valores mayores a 5(cinco).

El modelo final fue:

$$\text{TOTALM2} \sim \text{TOTALM1} + \text{Tratamiento}$$

Dicho modelo fue significativo F 15.2 (2 - 47 DF), con una $p < 8.27e-06$. Se puede explicar el 39.2% y con R^2 múltiple 36.6% que puede explicar la variación del

conjunto de variables explicativas. El 63.4% de la variación de TOTALM2 no está explicada.

Cuando las otras variables permanecen constantes, TOTALM1 es significativa ($p < 3.7e-06$, $\eta^2 = 0.35369$). Cuando las otras variables permanecen constantes, la variable tratamiento no es significativa ($p = 0.079$, $\eta^2 = 0.04142$).

Del modelo anterior se observaron 4 datos atípicos que se eliminaron quedando la base de datos (dat1) con 42 columnas y 46 filas. Se volvió repetir modelo lineal pero ahora sin datos atípicos que fueron en las filas 18,20,24 y 31. Se analizó el modelo final con la función LM que se encuentra en el archivo MBconRR.R (71). Los datos a eliminar se obtuvieron de las gráficas y de los datos del resumen LM

Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos. Existe evidencia de que los datos sigan una distribución diferente a la normal ($w=0.66$, $p=2e-09$).

Se realizó transformación Box-Cox para poder mostrar los resultados con una distribución normal usando la función boxcox del paquete MASS, obteniendo los siguientes resultados: $W = 0.98$, $p\text{-value} = 0.4$; mostrando así que los datos no sigan una distribución diferente a la normal.

El modelo final después de la transformación Box-Cox fue:

$z \sim b + \text{Tratamiento}$

Dicho modelo fue significativo con $F = 17.3$ (2 - 43 DF), con una $p < 3.03e-06$. Se puede explicar el 44.6% y con R^2 múltiple ajustada de 42% que puede explicar la variación del conjunto de variables explicativas. El 58% de la variación de TOTALM2(z) no está explicada. Cuando las otras variables permanecen constantes, TOTALM1(b) es significativa ($p < 5.4e-07$, $\eta^2 = 0.4336$). Cuando las otras variables permanecen constantes, Tratamiento no es significativa ($p = 0.14$, $\eta^2 = 0.0277$).

Códigos R y Rcmdr

```
setwd("/Users/PacoT/Desktop/resultados 20 julio/Resultados con jose luis")
```

```
dat <-
```

```
read.table("/Users/PacoT/Desktop/resultados 20 julio/Resultados con jose
luis/Analisis modelo 50 px.csv",
  header=TRUE, sep=";", na.strings="NA", dec=".", strip.white=TRUE)
Missing(dat)
dat <- within(dat, {
  AM <- as.factor(AM)
})
dim(dat)
head(dat)
str(dat)
summary(dat)
mod <- lm(TOTALM2 ~ TOTALM1 + Tratamiento + TI + AM + APACHEII, data=dat)
LM(mod)
leveneTest(mod$resid,dat$Tratamiento)
library(MASS)
boxcox(mod)
tmp<- boxcox(mod,lambda=seq(-0.2,0.3,length=10))
(lambda <- tmp$x[which.max(tmp$y)])
(dat$final <- dat$TOTALM2^lambda)
plot(mod,which=1)
mod1 <- lm(final ~ TOTALM1 + Tratamiento + TI + AM + APACHEII, data=dat)
LM(mod1)
leveneTest(mod1$resid,dat$Tratamiento)
mod2 <- lm(final~ TOTALM1 + Tratamiento + TI+ APACHEII, data=dat)
LM(mod2)
leveneTest(mod2$resid,dat$Tratamiento)
mod3 <- lm(final~ TOTALM1 + Tratamiento + TI, data=dat)
LM(mod3)
leveneTest(mod3$resid,dat$Tratamiento)
mod4 <- lm(final~ TOTALM1 + TI, data=dat)
LM(mod4)
```

```
leveneTest(mod4$resid,dat$Tratamiento)
mod5 <- lm(final~ TOTALM1 + TI, data=dat)
LM(mod5)
leveneTest(mod5$resid,dat$Tratamiento)
library(rms)
mod6 <- ols(final ~ TOTALM1,x=T,y=T,data=dat)
mod6
t.test(final ~ Tratamiento, alternative='two.sided', paired=FALSE, data=dat)
wilcox.test(final ~ Tratamiento, alternative='two.sided', paired=FALSE, data=dat)
SDStats(dat)
(6.354e+09-3.317e+09)
(3.037e+09/1.000e+10)
Browne(0.3037^2,47)
power.t.test(n = NULL, delta = 0.3037, sd = 0.3347, sig.level = 0.05, power = 0.8, type
= "two.sample", alternative = "two.sided")
```