

Artículo Original: Identificación de bacterias en circuitos de ventilación de máquinas anestésicas.

Original Article: Identification of bacteria present in ventilation circuits anaesthetic machine.

Yohanna Núñez¹ MV, Pablo Fariña² MV

RECIBIDO 29 Octubre 2015

ACEPTADO: 15 Marzo 2016

Resumen.

El principal objetivo de este estudio fue describir la microbiota aerobia que habita en las máquinas de anestesia, para lo cual se tomaron tres muestras de distintas áreas, correspondientes a la válvula inspiratoria, espiratoria y pieza en Y.

Para la realización de este estudio se seleccionaron 20 máquinas de anestesia pertenecientes a clínicas veterinarias de la Región Metropolitana, de las cuales se tomaron muestras solo de los circuitos cerrados.

Las muestras se recolectaron de forma aséptica, de la válvula inspiratoria, espiratoria y del tubo en Y, fueron obtenidas mediante frotación sobre la superficie con una tórula estéril, luego se realizó un análisis previo por microscopía directa y para posteriormente ser sembradas en medios de cultivos agar sangre. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C por 24 horas como mínimo.

Las tres zonas de la máquina de anestesia presentaron el mismo tipo de microorganismo *Bacillus spp.* y *Enterobacter spp.*, encontrándose en una mayor frecuencia, con respecto a las demás bacterias identificadas.

El antibiótico que demostró mayor efectividad fue la Doxiciclina y Ciprofloxacino, en donde las bacterias pesquisadas presentaron alta sensibilidad in vitro.

Palabras claves: Máquina de anestesia, válvula inspiratoria, válvula espiratoria, pieza en Y.

Abstract.

The main objective of this study was to describe aerobic microbiota that inhabits anesthesia machines, for this research three samples were taken from different areas corresponding to the inspiratory valve, expiratory and piece Y.

Choosing anesthesia machines was at random, the only parameters for the choice was that they should belong to the Metropolitan Region and only closed circuits samples were taken.

Samples collected from the inspiratory valve, expiratory and piece Y, were obtained by rubbing the surface with a sterile swab, then they were analyzed by direct microscopy

and seeded in blood agar culture media. All cultures were incubated at 37° C for 24 hours minimum.

The three areas of anesthesia machine had the same kind of microorganism *Bacillus spp.* and *Enterobacter spp.* which were found in a higher frequency than other bacteria detected.

The behavior of the most used antibiotics in veterinary clinical routine was also study to determine sensitivity of microorganisms found.

The most effective antibiotic was Doxycycline and Ciprofloxacin which showed high sensitivity in vitro.

Keywords: Anaesthetic machine, inspiratory valve, expiratory valve, piece Y.

Introducción.

En la actualidad el uso de la anestesia inhalatoria es considerada la técnica anestésica más importante en la práctica veterinaria. Las ventajas que posee son variadas aunque se destaca la posibilidad de un manejo del plano anestésico mucho más preciso y estable a diferencia de otras técnicas¹.

Todas las máquinas de anestesia inhalatoria son iguales en su fundamento, el animal ventila o es ventilado mecánicamente y es por este medio que se proporciona una mezcla gaseosa precisa y variable (oxígeno y anestésico) al circuito de respiración, que dirige estos gases hacia el paciente, elimina el CO₂ espirado y permite controlar la ventilación¹.

La máquina de anestesia, consta de distintas partes y piezas, una de las principales y más importantes es el vaporizador que tiene como función añadir anestésico al gas portador. También se encuentran las válvulas unidireccionales (inspiratoria y espiratoria) las cuales permiten que el flujo tenga solo una dirección. Estas válvulas están conectadas por medio de tubos corrugados y una pieza en Y al paciente. La bolsa de reserva se llena a medida que entra gas al circuito y se vacía cuando el paciente respira. El Cánister que en su interior posee Cal Sodada y permite la retención de CO₂, entre otras¹.

Dentro del funcionamiento de la máquina anestésica se encuentran tres sistemas: cerrados, semicerrados y abiertos. La elección de este, está dada por el peso del paciente, correlacionado con el volumen tidal y el espacio muerto, lo cual determinará si el paciente volverá a reinhalo los gases espirados, que tipo de caudales de oxígeno utilizará, la posición de la válvula de sobrecarga y el tipo de equipamiento que se necesita para el soporte anestésico¹.

La máquina de anestesia está estrechamente relacionada con el paciente, es por esto que la temática de contaminación bacteriana y de infecciones nosocomiales ha sido un tema polémico en medicina humana en la última década, donde se establece en varios estudios que es posible el contagio de infecciones bacterianas en pacientes sometidos a procedimientos bajo anestesia inhalatoria.

Estudios realizados en medicina humana demuestran que las bacterias causantes de infecciones nosocomiales han sufrido grandes cambios a lo largo del tiempo, y en un inicio los patógenos predominantes detectados fueron principalmente Gram positivos. Luego, con la introducción de los antibióticos se produjo una disminución de estas infecciones pasando a ser producidas mayoritariamente por bacterias Gram negativas².

¹- Médico Veterinario. Universidad Santo Tomás.

²- Médico Veterinario. Servicio de Cirugía, Universidad Santo Tomás y clínica veterinaria CLAN.

Entre los principales agentes bacterianos Gram positivos aislados en medicina humana, se puede mencionar las cocáceas *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, y *Enterococcus* spp, principalmente *E. faecium* *E. faecalis*. Entre los bacilos Gram negativos no fermentadores *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las Enterobacterias *Klebsiella Pneumoniae* y *Escherichia coli* como bacilos fermentadores. En el caso de la Medicina Veterinaria, las bacterias descritas como nosocomiales no difieren mucho de las aisladas en humanos y así encontramos a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. La importancia de estas bacterias radica en que la gran mayoría de ellas son naturalmente resistentes a antimicrobianos o poseen la habilidad de adquirir esta resistencia².

En medicina veterinaria existe conciencia del peligro que conlleva el establecimiento de infecciones nosocomiales, pero generalmente no se toman las precauciones necesarias para evitar estos tipos de contagios, además que la cantidad de estudios relacionados con esta área son escasos.

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de bacterias aerobias y anaerobias facultativas mesófilas en los circuitos cerrados de ventilación anestésica, específicamente en las válvulas unidireccionales inspiratoria, espiratoria, además de la pieza en Y. Posteriormente evaluar mediante antibiograma la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias pesquisadas.

Materiales y Método.

Se consideró un tamaño muestral de 20 máquinas de anestesia, ubicadas en distintas clínicas veterinarias de la Región Metropolitana, de las cuales

se muestrearon tres áreas: válvula inspiratoria, espiratoria y pieza en Y de circuitos cerrados. En total se recolectaron 60 muestras. El método utilizado para el muestreo se basó en el método de control microbiológico tradicional. La recolección de las muestras se realizó de forma aséptica, mediante tómulas estériles, las cuales fueron previamente embebidas en solución fisiológica 0,9%, para posteriormente ser deslizadas sobre las superficies a muestrear. Una vez realizada la toma de muestras, la tómula utilizada se introdujo en un medio de transporte (Stuart) para su conservación.

Para la detección de bacterias aerobias se sembró en placas de agar sangre, directamente de la tómula, para después ser incubada en estufa de cultivo, bajo condiciones de aerobiosis a 37°C por 24 horas. En todos los cultivos realizados, se dejó una placa de control sin sembrar, para medir el grado de contaminación externa que pudiese existir. Posteriormente se realizó un análisis macroscópico de las colonias, tinción de Gram, además de distintas pruebas bioquímicas de acuerdo a cada caso.

Las cepas aisladas e identificadas, fueron sometidas a una determinación de sensibilidad in vitro (antibiograma tradicional) frente a distintos antibióticos.

El antibiograma se realizó con el método de difusión en disco de papel con la técnica de Kirby y Bauer. Se utilizaron discos con distintos antibióticos: Doxiciclina, Cloranfenicol, Clindamicina, Amoxicilina más Ácido Clavulánico, Ciprofloxacino.

Análisis estadístico.

Se describió la microflora bacteriana, en términos de porcentajes de presentación y distribución, además de tablas de frecuencia presente en cada área estudiada de la máquina de anestesia, correspondientes a la válvula inspiratoria, espiratoria y pieza en Y.

Resultados.

El presente estudio permitió identificar la microbiota aerobia y anaerobia facultativa mesófila existente en máquinas de anestesia. Del total de las 60 muestras extraídas desde las 20 máquinas de anestesia seleccionadas hubo desarrollo bacteriano en un 67% del total de las muestras estudiadas, en contraste un 33 % del total de muestras no presentó crecimiento bacteriano evidente después de las 24 horas de incubación.

Al analizar la flora bacteriana aislada mediante tinción de Gram, se observó que estuvo compuesta principalmente por bacilos Gram negativos (gráfico 1).

El 52% del total de los cultivos, presentó crecimiento monomicrobiano, en cambio un 18,3% de los cultivos realizados presentó crecimiento polimicrobiano. Con

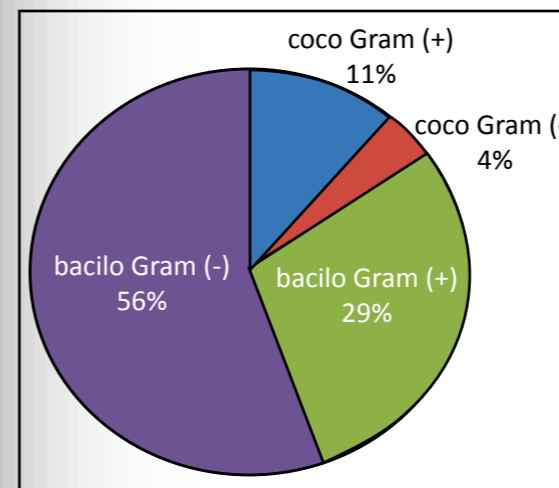


Gráfico 1. Composición bacteriana presente en circuitos cerrados de máquinas de anestesia.

Tabla 1. Número de muestras y su composición en porcentajes.

CONDICIÓN DE LOS CULTIVOS	T.Y.	%	V. ESP.	%	V. INS.	%
MUESTRA CON DESARROLLO	19	95	13	65	10	50
MUESTRA SIN DESARROLLO	1	5	7	35	10	50
TOTAL MUESTRAS	20	100	20	100	20	100

respecto a la presencia o no de desarrollo microbiano, los tubos en Y obtuvieron un 95% de cultivos con desarrollo bacteriano, en cambio el total de válvulas inspiratorias presentó escaso desarrollo obteniendo un 50% de cultivos estériles y un 50% de agares con crecimiento. Considerando el total de las observaciones, se puede desarrollar un análisis de la microbiota aerobia aislada, la cual se resume a continuación en la tabla 1.

Producto de la realización de distintas pruebas diferenciales y bioquímicas, se identificaron ocho géneros bacterianos distintos: *Bacillus* spp. (42,9%), *Enterobacter* spp. (28,6%), *Streptococcus* spp. (7,1%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (4,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (4,8%), *Proteus* spp. (4,8%), *Staphylococcus aureus* (4,8%), *Corynebacterium* spp. (2,4%). Del total de microorganismos aislados, los identificados de forma más frecuente son los géneros *Bacillus* spp. y *Enterobacter* spp., los cuales presentaron desarrollo en las tres áreas muestreadas de las máquinas de anestesia. Los resultados obtenidos sobre los microorganismos aislados, son similares con estudios realizados por Elvir⁶.

En el total de válvulas inspiratorias muestreadas (gráfico 2), hubo mayor desarrollo de especies del género *Enterobacter* spp. y de *Bacillus* spp., resultados similares se obtuvieron en las muestras obtenidas desde las válvulas espiratorias en donde también hubo mayor predominio del género *Bacillus* spp

y de *Enterobacter spp.* (gráfico 3). En el muestreo realizado de piezas en Y también se detectó mayor predominio de bacterias pertenecientes a los géneros mencionados (gráfico 4).

Se realizó antibiograma para determinar la sensibilidad antibiótica de las ocho especies bacterianas identificadas. Se utilizaron cinco antibióticos diferentes: Amoxicilina más Ácido Clavulánico, Ciprofloxacino, Doxiciclina, Clindamicina,

Cloranfenicol. Los mayores índices de inhibición bacteriana los obtuvo el Ciprofloxacino y la Doxiciclina, en cambio los niveles de resistencia mayor se observaron con la Clindamicina (gráfico 5). Es importante considerar que el uso de antibióticos contribuye a disminuir la carga bacteriana, previene infecciones sistémicas, favorece el éxito de los tratamientos en general y además se pueden usar para tratar y eliminar una infección bacteriana establecida.

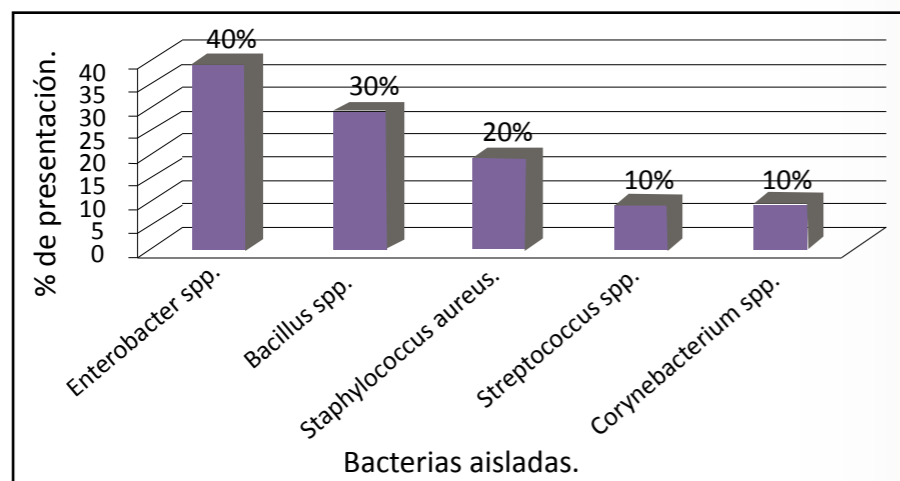


Gráfico 2. Distribución según tipo de crecimiento bacteriano en válvulas inspiratorias de máquinas anestésicas.

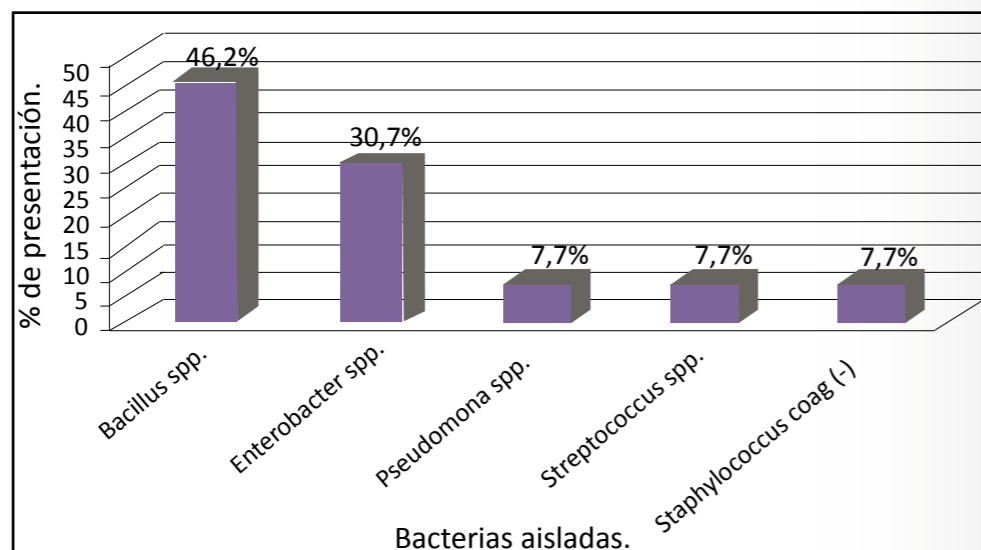


Gráfico 3. Distribución según tipo de crecimiento bacteriano en válvulas espiratorias de máquinas anestésicas.

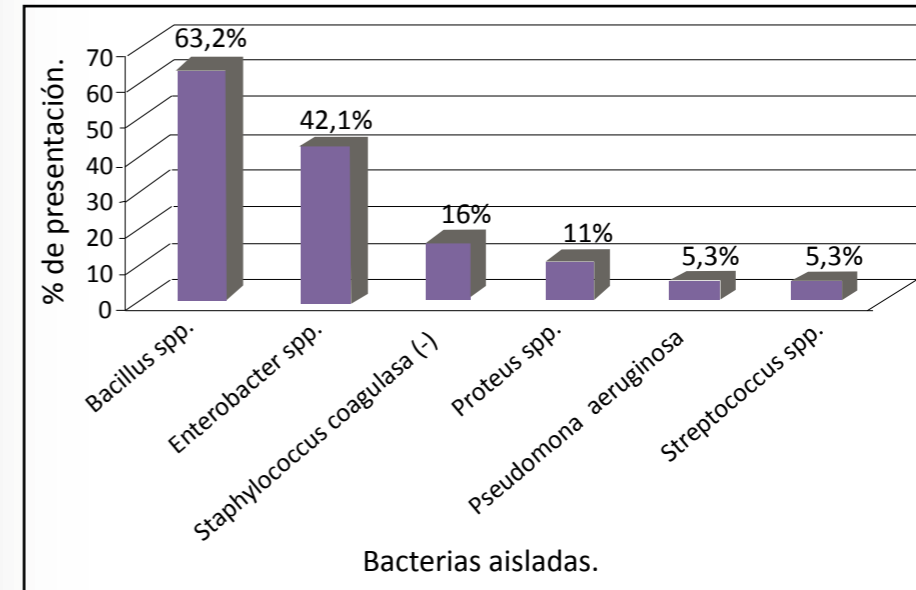


Gráfico 4. Distribución según tipo de crecimiento bacteriano en piezas en Y de máquinas anestésicas.

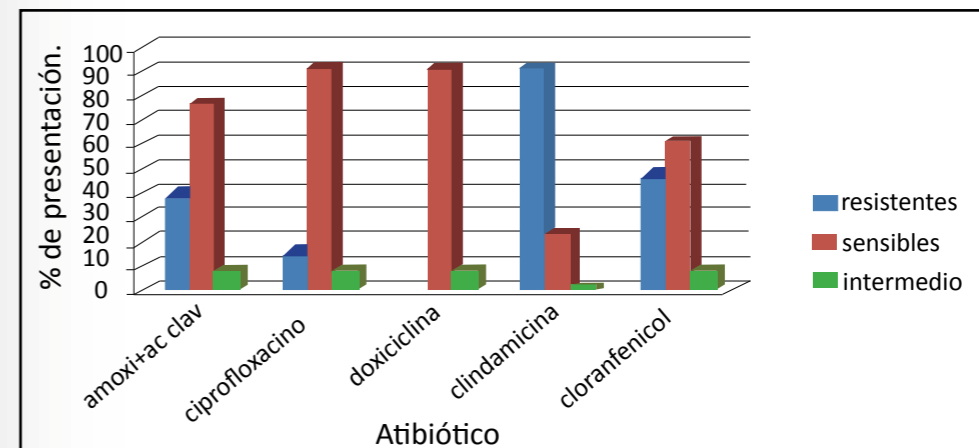


Gráfico 5. Porcentajes de sensibilidad y resistencia de los microorganismos aislados.

Discusión.

Del total de muestras recolectadas, un 56% corresponde a bacilos Gram negativos, dentro de los cuales están la familia Enterobacteriaceae (*Enterobacter spp.* y *Proteus spp.*) y *Pseudomonas aeruginosa*. Las Enterobacterias se encuentran generalmente en el medio ambiente, agua, suelo superficies inertes, etc. El género Enterobacter está asociado principalmente a patologías humanas, siendo un patógeno nosocomial de neonatos y pacientes inmunocomprometidos. Los

miembros del género *Pseudomonas* son microorganismos ubicuos y se encuentran en el suelo, compuestos orgánicos en descomposición, vegetación y agua, también se encuentra en el medio ambiente hospitalario, en reservorios húmedos como alimentos, lavaderos, trapos para fregar suelos, equipos de terapia respiratoria e incluso en soluciones desinfectantes. Su amplia distribución se debe a sus exigencias nutricionales son sencillas y versátiles. Estos microorganismos son fundamentalmente oportunistas y aerobios obligados, lo que evidencia su desarrollo en muestras de

válvulas espiratorias. Las enfermedades que puede causar comprenden infecciones respiratorias, urinarias, de piel y tejidos blandos entre otras. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria potencialmente nosocomial, que puede colonizar de forma transitoria el tracto respiratorio y digestivo de pacientes hospitalizados, fundamentalmente de aquellos tratados con antibióticos de amplio espectro, que están sometidos a equipos de ventilación mecánica o que están hospitalizados por tiempo prolongado^{2,3,4,5,6,7,8}

Un 21% corresponde a bacilos Gram positivos pertenecientes en su gran mayoría al género *Bacillus spp.*, según lo descrito por Stanchi³, estos microorganismos que presentan la capacidad de desarrollarse sobre una gran variedad de sustratos, dentro de un amplio rango de temperatura y pH, según la especie, todo esto sumado a la capacidad de formar esporas, que permiten su resistencia a factores ambientales adversos, lo que les permite tener una amplia distribución en la naturaleza, sobre todo en suelos vegetales y agua. Es un género que en general se considera patógeno oportunista en medicina humana, es de baja virulencia y suele asociarse solo a pacientes inmunocomprometidos expuestos directamente a material contaminado. En medicina veterinaria no posee significancia clínica, por lo tanto no es un género de riesgo de infección intrahospitalaria. *Staphylococcus aureus* y otros cocos Gram (+), se encontraron dentro los resultados, estos son microorganismos que están presentes en piel y mucosas del ser humano, otros mamíferos y aves. Otros están asociados con procesos supurativos, infecciones óseas, de piel, tejidos blandos, neumonía, además son bacterias oportunistas y pueden ser patógenos causantes de enfermedades intrahospitalarias. *Corynebacterium spp.* también fue un género descrito dentro de los Gram (+). Son microorganismos ubicuos

en plantas y animales, pueden colonizar normalmente piel, aparato respiratorio superior, aparato digestivo y genitourinario. Pueden comportarse como patógenos oportunistas pero pocas especies se asocian con una mayor frecuencia a enfermedades^{6,7}

De las 60 muestras cultivadas se obtuvo un 67% de desarrollo bacteriano dentro de los cuales un 54% correspondió a cultivos monomicrobianos, y un 15% fue desarrollo polimicrobiano. En contraste 33% de los cultivos, no desarrolló ningún tipo de microorganismo después de las 24 horas de incubación, lo cual coincide con un bajo nivel de contaminación microbiana, que pudo haber estado relacionado con un cambio reciente del circuito, o haber realizado una desinfección y limpieza eficientes antes de obtener las muestras.

Del total de muestras recolectadas, existió mayor predominio de crecimiento bacteriano en los tubos en Y, en donde se observó un 95% de crecimiento bacteriano, lo cual indica que dentro del circuito, esta área es la que presenta mayor cantidad de microorganismos. Esta pieza del circuito generalmente no recibe ningún tipo de limpieza, tampoco es cambiada con regularidad, además es la zona que está más cercana al tubo endotraqueal conectada al paciente, por lo tanto el intercambio de microorganismos mediante la ventilación máquina – paciente, suele estar presente constantemente durante un procedimiento bajo anestesia inhalatoria. Esto también se correlaciona con la cantidad de microorganismos presentes en la válvula espiratoria, que también tuvo un porcentaje alto (65%), lo cual se debe a la dirección del flujo de gases dentro del circuito cerrado que va desde el tubo en Y hacia esta válvula que posteriormente pasará al Cánister, en donde se encuentra la Cal Sodada que según estudios realizados por Castro y Bentes¹, presenta ciertas propiedades bactericidas, lo que disminuiría la carga

microbiana existente, para luego volver a tener contacto con el paciente, mediante la válvula inspiratoria, la cual presentó menor desarrollo microbiano del total de las muestras recolectadas en este estudio, con un 50% de muestras que no presentaron crecimiento. Estos resultados, no fueron posibles compararlos con la literatura, ya que, no se encontró ningún estudio que fuese similar.

En el total de cultivos realizados en este estudio se encontraron los siguientes microorganismos: *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus coagulasa (-)*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus aureus*. Algunos de estos, concuerdan con los encontrados en estudios anteriores por Elvir⁶ y que podrían ser causantes de enfermedades nosocomiales.

Muchos de estos microorganismos aislados son capaces de producir neumonía bacteriana en perros y gatos. Según Ettinger y Feldman⁸, los microorganismos aislados a menudo del aparato respiratorio de los perros con neumonía bacteriana comprenden los siguientes microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, algunas cepas de *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Bordetella Bronchiseptica*, *E.coli*, *Pasteurella Multocida*, *Klebsiella spp.* algunas de estas bacterias fueron encontradas en este estudio, por lo tanto, es posible considerar la posibilidad de contaminación máquina-paciente. En gatos además, se encuentran bacterias del género *Proteus spp.* y *Streptococcus spp.*, que también son causantes de neumonía^{8,9,10}.

En relación al estudio de sensibilidad antimicrobiana, en el total de muestras existe alta sensibilidad a los antibióticos, excepto la Clindamicina que arrojó un gran porcentaje de resistencia. Lo cual se debe a que esta lincosamida semisintética es

activa principalmente frente a bacterias anaerobias, y gran porcentaje de los microorganismos aislados fueron bacilos Gram negativos aerobios^{11,12,13}.

Los antibióticos que presentaron mayor halo de inhibición frente a las bacterias estudiadas corresponden a Ciprofloxacino, que es un antibiótico bactericida, perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, es activo contra Gram positivos y Gram negativos, incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp.* La Doxiciclina, también presentó una alta inhibición frente a los microorganismos de este estudio. Este antibiótico pertenece a la familia de las tetraciclinas liposolubles, es un agente bacteriostático, principalmente activo contra Gram negativos^{14,15,16,17}.

En general los sistemas corrugados son desechables, lo que quiere decir que solo deben ser utilizados una vez, para luego ser eliminados. Las recomendaciones básicas son: cambiar el sistema de ventilación completo (sistema corrugado y tubo en Y), al finalizar el procedimiento anestésico de cada paciente, además utilizar un filtro para bacterias y virus, que en la práctica veterinaria, pocas clínicas lo utilizan. Este filtro debe estar ubicado en el brazo inspiratorio, y debe ser único para cada paciente^{18,19,20, 21}

Conclusiones.

Con la realización de este estudio se pudo comprobar la presencia de microorganismos dentro de los circuitos de ventilación anestésica.

La mayor frecuencia de aislamiento correspondió a bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y a *Pseudomonas aeruginosa*. Las Enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetación además están presentes en la flora intestinal normal de muchos

animales incluyendo el ser humano, algunas Enterobacterias se asocian siempre a enfermedad en el ser humano y en animales, mientras que otras forman parte de la flora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas.

Entre las tres áreas muestreadas de las máquinas de anestesia, se evidenció mayor desarrollo de colonias en el tubo en Y, con respecto a la válvula inspiratoria y espiratoria, debido al mayor contacto que posee esta área con el paciente, además que esta pieza desechable no es cambiada con regularidad y tampoco se desinfecta adecuadamente.

Dentro de los antibióticos testeados, se concluye que Ciprofloxacino y Doxiciclina son los antibióticos más efectivos para la eliminación de los microorganismos de mayor frecuencia encontrados en este estudio, que según la literatura son microorganismos que están presentes en infecciones asociadas a patologías respiratorias en pequeños animales.

El circuito ventilatorio que se utilice para realizar un procedimiento bajo anestesia inhalatoria en cada paciente debe ser nuevo en todos los casos, además debe estar provisto de filtros para bacterias y virus adicionado con un humidificador, también es importante el buen uso y recambio periódico de la Cal Sodada, limpiar y desinfectar regularmente las válvulas unidireccionales y todos los materiales e instrumentos con que se permeabiliza la vía aérea, haciendo énfasis en el lavado de manos del personal entre cada paciente.

Referencias Bibliográficas

1. Castro L, Bentes R. Contamination of Anesthesia Circuits by Pathogens. *Revista Brasileña de Anestesiología*; 2011, 61: 50-59.
2. Jara MA, Avendaño P, Navarro C. Identificación y estudio de

susceptibilidad antimicrobiana de bacterias potencialmente responsables de infecciones nosocomiales en los hospitales veterinarios de la Universidad de Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*; 2009, 24: 11-17.

3. Stanchi N. *Microbiología Veterinaria*. 1ª edición. Intermédica. México; 2007.
4. Fung S, Yu D. Unusual Dissemination Of Pseudomonas By Ventilators. *The Association of Anaesthetists of Gt Britain and Ireland*; 1982, 37: 1074-1077.
5. Hartmann D, Jung M, Neubert T, Susin C, Nonnenmacher C, Mutters R. Microbiological Risk of Anaesthetic Breathing circuits After Extended use. *The Acta Anaesthesiologica Scandinavica Foundation*; 2008, 52: 432-436.
6. Jawetz E, Melnick J, Adenberg E. *Microbiología Médica*. 18ª edición. El Manual Moderno. España; 2005, 256-258.
7. Kishi D, Luis da Rocha R. Descripción de las Prácticas de Prevención de Infección Hospitalaria por Anestesiólogos en un Hospital Universitario. *Revista Brasileira de Anestesiología*; 2011, 61: 95-100.
8. Koneman Elmer W, Allen Stephen D, Janda William M, Schreckenber C. *Diagnóstico Microbiológico*. 5ª edición. Panamericana. Argentina; 2004:74-163.
9. Ettinger S, Feldman E. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. 6ª edición. Elsevier. España; 2007, 212-218.
10. Murray R, Rosenthal S, Pfäuer M.

Microbiología Médica. 5ª edición. Elsevier. España; 2009: 213-236, 323-338.

11. Olds J, Kisch A, Eberle B, Wilson J. Pseudomonas aeruginosa Respiratory Tract Infection Acquired from a Contaminated Anesthesia Machine. *Am Rev Respir Dis*; 1972, 105(1):629-632.
12. Brooks Geo F., Butel Janet S., Morse Stephen A. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 18ª edición. Editorial Manual Moderno. México; 2001: 430.
13. Biberstein E, Chung Zee J. *Tratado de Microbiología Veterinaria*. Editorial Acribia. España; 1994: 100- 167.
14. Elvir O, Pineda M, Galo C. Reutilización de circuitos de ventilación anestésica, un factor de riesgo de infección nosocomial. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*; 2009, 1: 9-16.
15. James H. Gram Negative Rod Contamination of an Ohmeda Anesthesia Machine. *American Society of Anesthesiologists*; Inc.2000, 92: 911-915.
16. Nicolet J. *Compendio de Bacteriología Médico Veterinaria*. Ed Acribia S.A.. España; 1986: 77-115.
17. Prat M. *Manual De Prueba De Susceptibilidad Antimicrobiana Por Difusión En Agar*. Instituto de Salud Pública. Gobierno de Chile Ministerio de Salud; 2004: 2 – 40.
18. Papich M. Antimicrobials, Susceptibility Testing, and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in Veterinary Infection Treatment. *Vet Clin Small Anim*; 2013, 43: 1079-1089.

19. Papich M. Antibiotic Treatment of Resistant Infections in Small Animals. *Vet Clin Small Anim*; 2013, 43: 1091-1207.
20. Leijten D, Reijger V, Mouton R. Bacterial contamination and the effect of filters in anaesthetic circuits in a simulated patient model. *Journal of Hospital Infection*; 1992, 21, 51-60.
21. Stockton K, Morley P, Hyatt D, Burgess B, Patterson G, Dunowska M, Lee D. Evaluation of the Effects of Footwear Hygiene Protocols on Nonspecific Bacterial Contamination of Floor Surface in an Equine Hospital. *JAVMA*; 2006, 228: 1068-1976.