

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

CARRERA: QUÍMICA-FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA

ORIENTACIÓN: BIOQUÍMICA –CLÍNICA

OPCIÓN DE TITULACIÓN: TESIS EXPERIMENTAL

TÍTULO DE LA TESIS: **"CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO EN COMPONENTES SANGUÍNEOS EN UN BANCO DE SANGRE"**

NOMBRE DEL DIRECTOR DE LA TESIS : Q.F.B. JOSÉ LUIS ALCARAZ LÓPEZ

NOMBRE DE LA ASESORA DE TESIS: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN

NOMBRE DE LA TESISISTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE Q.F.B.: VARGAS MADRID SILVIA YOLANDA

Lugar donde se desarrolló el trabajo: Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por brindarme una infinidad de oportunidades y la más grande de ellas la vida; sin ella no llevaría a término este proyecto.

A MI MAMÁ YOLANDA: Por tú amor, apoyo, confianza, fortaleza y desvelos incondicionales. Sin ti no sería lo que soy.

A MI PAPÁ DAVID: Gracias por tú amor, apoyo y confianza que me has mostrado a lo largo de mi vida.

A MI HERMANO JOSÉ DAVID: Por la amistad franca y sincera que siempre me has dado, por tú apoyo incondicional en las buenas y en las malas. Por ser el hermano excepcional que eres para mí.

A ti mi pequeño, pero muy fuerte motor que me impulsa hasta lo más alto, A MI HIJA ELIZABETH YARATZED, gracias por motivarme a terminar mis proyectos y seguir adelante, TE AMO BEBÉ.

AL Q.F.B. José Luis Alcaraz López, por darme la confianza de realizar este proyecto, por apoyarme hasta el final y además por todas sus enseñanzas.

A LA Q.F.B. Patricia Vidal Millán, por ser exigente para llegar a la perfección y así motivarme a aprender cada día más.

A todos mis sinodales por sus críticas constructivas y por ser cimientos con todas sus enseñanzas durante la carrera.

Gracias por su apoyo y ayuda a: T.L.C. Santa Espinoza, T.L.C. Octavio Oblajero, T.L.C. Raúl Jaramillo, Q.F.B. Andrea Alonso, E.B.C. Julio César Martínez, Q.F.B. Ruth Bonilla Zavala Q.B.P. Angeles Ochoa Rico, Q.F.B. Ma. Emilia Gómez Q.B.P. Dolores Uribe y todas las personas de BCS.

Agradezco infinitamente por compartir su experiencia en microbiología conmigo y apoyarme siempre a: Q.F.B. Ma. de Lourdes González Tejeda, Q.F.B. Ma. del Carmen Garay Arias, Q.B.P. Martha Camacho Velázquez, Q.F.B. Ma. Guadalupe Valadez Mejía, Q.F.B. Miguel Angel Juárez Herrera, M. en C. César Jiménez Galicia, Q.F.B. Roberto Martínez Velázquez, T.L.C. Ma. Luisa Reyes Muñiz, T.L. Leticia Margarita Ramírez Martínez, T.L.C. Carmen Pérez Elizalde; todos ellos de la sección de microbiología del Hospital de Pediatría- Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

La vida

La vida es una oportunidad, aprovéchala.

La vida es belleza, admírala.

La vida es dicha, saboréala.

La vida es un sueño, hazlo realidad.

La vida es un reto, afróntalo.

La vida es un deber, cúmplelo.

La vida es un juego, júgalo.

La vida es costosa, cuídala.

La vida es riqueza, consévala.

La vida es amor, gózala.

La vida es un misterio, devélalo.

La vida es una promesa, lógrala.

La vida es tristeza, supérala.

La vida es un himno, cántalo.

La vida es un combate, acéptalo.

La vida es una tragedia, enfréntala.

La vida es aventura, arróstrala.

La vida es suerte, persíguela.

La vida es preciosa, no la destruyas.

La vida es la VIDA, defiéndela.

Madre Teresa de Calcuta

ÍNDICE

I. RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. GENERALIDADES	2
2.2. HISTORIA DE LA CONTAMINACIÓN Y LA RECOLECCIÓN DE SANGRE	6
2.3. CONCENTRADO(S) PLAQUETARIO(S) (C.P.)	7
2.4. PLASMA	9
2.5. CONCENTRADO(S) ERITROCITARIO(S) (C.E.)	9
2.6. REQUERIMIENTOS PARA UNA PRUEBA IDEAL	10
2.7. TÉCNICAS PARA DETECTAR CONTAMINACIÓN BACTERIANA	11
2.7.1. CULTIVO	11
2.7.2. EXÁMENES MICROSCÓPICOS-NARANJA DE ACRIDINA Y TINCIÓN DE GRAM	12
2.7.3. INSPECCIÓN VISUAL-CONCENTRADOS ERITROCITARIOS: CAMBIO DE COLOR	12
2.7.4. INSPECCIÓN VISUAL-CONCENTRADOS PLAQUETARIOS: SWIRLING	12
2.7.5. MEDICIONES METABÓLICAS-TIRAS INDICADORAS MULTI-REACTIVOS	13
2.7.6. MEDICIONES METABÓLICAS-ANÁLISIS DE GAS SANGUÍNEO	13
2.7.7. ENSAYOS DE ENDOTOXINAS	13
2.7.8. TÉCNICAS DE ADN/ARN	13
2.8. CARACTERÍSTICAS DE LAS REACCIONES SÉPTICAS TRANSFUSIONALES	14
2.9. CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS CRIOPRESERVADAS	14
2.10. GENERALIDADES DEL BacT/Alert®	15
2.10.1. FUNDAMENTO DEL BacT/Alert®	17
3. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA	20
3.1. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO DEL PROBLEMA	20
4. OBJETIVO GENERAL	21
4.1. OBJETIVO PARTICULAR	21
5. HIPÓTESIS GENERAL	22
5.1. HIPÓTESIS PARTICULAR	22
6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	23
7. VARIABLE DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE	23
8. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN	24
9. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS	25
10. MÉTODO	27
10.1 DIAGRAMA DE FLUJO	28
11. RESULTADOS	29
12. DISCUSIÓN	39
13. CONCLUSIONES	45
14. RECOMENDACIONES	46
ANEXO 1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	48
GLOSARIO	60
REFERENCIAS	61

I. RESUMEN

El presente trabajo tuvo su origen al considerar la importancia de conocer la frecuencia de contaminación bacteriana en componentes sanguíneos ó también llamadas fracciones sanguíneas, que son transfundidos; mismos que han sido asociados con sepsis, Coagulación Intravascular Diseminada (CID) y muerte en los receptores. Es de particular interés la población de donadores del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) que acuden al BCS CMN SXXI (Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI).

Hasta la fecha la información sobre estudios de control de calidad bacteriológico en componentes sanguíneos en nuestro país es nula; por lo que se propuso desarrollar una metodología de las fracciones sanguíneas que ayuden a disminuir el riesgo de transmisión de bacterias al receptor; además de conocer cual es la frecuencia y el tipo de contaminación bacteriana aquí en México.

Se incluyeron en el estudio 1641 fracciones sanguíneas diferentes; sólo de donadores del Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, tanto de sistema abierto como de sistema cerrado. Se realizó el muestreo de los componentes y se inocularon las botellas de cultivo Pedi-Bact[®] y/ó SA[®] utilizadas para el equipo BacT/Alert[®] donde fueron incubadas y sensadas para detectar positivos ó negativos según el caso.

Se encontró que en la población de estudio, el sistema abierto es el más contaminado con una frecuencia de 0.85%, mientras que en el sistema cerrado tiene una frecuencia de 0.36%; en total se encontró una frecuencia de 1.22% de contaminación bacteriana en los componentes sanguíneos, similar a la de otros países.

Con base en los resultados obtenidos, los microorganismos que se encontraron fueron en su mayoría de la biota nativa de la piel, como *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus coagulasa* negativos, además de patógenos oportunistas por ejemplo a: *Pseudomonas aeruginosa*; es decir, hay tanto Gram positivos como Gram negativos.

1. INTRODUCCIÓN

Un efecto catastrófico de la transfusión sanguínea puede llegar a ser la muerte del paciente que la recibe, a causa de un producto sanguíneo que contiene bacterias.

Algunos de los episodios sépticos que se han informado en algunos pacientes, receptores de productos sanguíneos se han observado en los Concentrados Plaquetarios (C.P.), ya que debido a las condiciones de su almacenamiento (temperatura ambiente), es muy fácil que este se contamine.

Son diversos los microorganismos capaces de contaminar las fracciones sanguíneas, sin embargo, los más comunes son los que conforman la biota nativa de la piel y los patógenos oportunistas tanto Gram positivos como Gram negativos.

Por lo anterior, se considera necesario conocer la frecuencia y el tipo de contaminación en México de los diferentes componentes sanguíneos, además de implementar una metodología que sea sensible y rápida y que el producto proporcione confianza en que cumple con todos los requisitos de calidad.

Debido a que en los bancos de sangre del país, no se encuentra establecido un manual de procedimientos donde se indique el método que describa el control de calidad microbiológico de la sangre y sus componentes se decidió llevar a cabo esta investigación en el BCS CMN SXXI-IMSS, para observar y analizar la incidencia de la contaminación bacteriana en las fracciones sanguíneas del sistema cerrado y sistema abierto.

De tal manera que debemos de tener en claro las definiciones de calidad, control de calidad y aseguramiento de la calidad, pues básicamente de esto tratará este proyecto.

Calidad.

Grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con las necesidades o expectativas establecidas, generalmente implícita u obligatoria.

Control de Calidad.

Parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de la calidad.

Aseguramiento de la Calidad.

Parte de la gestión de la calidad orientada a proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos de la calidad.⁽¹⁾

2. MARCO TEÓRICO

Uno de los primeros efectos adversos de la transfusión de la sangre que se reconoció fue la posibilidad de producir sepsis en pacientes transfundidos con productos de la sangre contaminados con bacterias. La contaminación bacteriana de los productos de la sangre es poco frecuente pero cuando se presenta, puede producir Coagulación Intravascular Diseminada (CID) y hasta la muerte en un 26% de los pacientes que desarrollan sepsis.^(2,3)

Las fuentes de contaminación bacteriana de los donadores de sangre, es por dos vías: una endógena y otra exógena.^(4,5)

2.1. GENERALIDADES

Contaminación endógena: Esta puede ser por infecciones bacterianas, pero ocasionalmente personas que aparentemente se ven saludables pueden tener una bacteremia asintomática. Esto puede ocurrir durante el período de incubación o de recuperación de una infección; por ejemplo: infecciones gastrointestinales o una extracción dental.

Contaminación exógena: Existen dos tipos de biota bacteriana normalmente en la piel humana, la transitoria y la nativa. Una preparación inadecuada del área de la piel durante la flebotomía ó venopunción es una de las causas más frecuente que puede causar contaminación bacteriana de los productos de la sangre debido a bacterias provenientes de la piel del donante. Una teoría es que la contaminación es causada por un tapón de la piel en el momento del piquete por la aguja. Parte de la contaminación puede ser prevenida por descarte del primer volumen de sangre (conteniendo el tapón de piel), durante la colección, como sugieren los resultados *in vitro* de Wagner y colaboradores.⁽⁶⁾

Biota transitoria: Incluye bacterias que contaminan la parte superficial de la piel por períodos relativamente cortos. Estas bacterias no se multiplican y no tienen mayor contacto con la piel. De tal manera, que se pueden remover fácilmente al lavarse con agua y jabón. Las bacterias que se encuentran en la biota transitoria son: *Staphylococcus*, mycobacterias no patógenas, bacilos formadores de esporas, *Streptococcus α-hemolíticos*, *Enterococcus* y levaduras.^(7,8)

Biota nativa: Vive y se multiplica entre las células de la piel y lípidos de la piel. En la fosa cubital anterior del brazo se pueden encontrar cocos Gram positivos, coagulasa negativos, algunos bacilos Gram negativos y otras especies. La biota nativa residente juega un papel protector ya que resiste la colonización de otras bacterias patógenas.⁽⁸⁾ Esta flora es difícil de remover con el lavado convencional de agua y jabón pero se puede disminuir su número en forma substancial si se usan soluciones antisépticas.

Sin embargo, la biota nativa de la piel no es equivalente a contaminantes menos inofensivos sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.⁽⁶⁾

En varios estudios la mayoría de las bacterias fueron identificadas como especies de *Staphylococcus* o *Propionibacterium*, que es común de la biota nativa de la piel y contaminantes ambientales.⁽⁶⁾

Aunque la contaminación bacteriana en los productos sanguíneos puede ser infrecuente, es muy importante llevar a cabo un control bacteriológico para demostrar que la sangre transfundida es 100% segura, es decir, sin ningún tipo de bacteria.

En un estudio realizado por Goldman y colaboradores, evaluaron 4 diferentes técnicas de antisepsia para eliminar la mayor población de bacterias del brazo del donador antes de su donación; donde utilizaron:

1- Yodopolividona al 7.5% equivalente a 0.75% de yodo viable y yodopolividona al 10% equivalente al 1% de yodo viable.

2- Alcohol isopropílico al 70% y tintura de yodo al 2%.

3- Jabón verde y alcohol isopropílico al 70%.

4- Gluconato de clorhexidina al 0.5% y alcohol isopropílico al 70%.

Aplicados cada uno por 30 segundos; ellos encontraron que los más efectivos fueron el de alcohol isopropílico al 70% y tintura de yodo al 2%, seguido de la técnica de gluconato de clorhexidina al 0.5% y alcohol isopropílico al 70%, en tercer lugar la de yodopolividona al 7.5% y yodopolividona al 10% y finalmente la menos efectiva la de jabón verde y alcohol isopropílico al 70%. Aunque la Asociación Americana Bank Blood (AABB), sugiere el uso de yodopolividona al 7.5% y yodopolividona al 10%.⁽⁹⁾

En el medio laboral de los bancos de sangre de nuestro país, no se ha establecido ningún manual de procedimientos que indique una metodología a seguir en cuanto al control bacteriológico de la sangre y sus componentes.

Lo único que se ha podido recopilar de este control es verbalmente; la metodología es transmitida de persona a persona.

En lo que se refiere a la NOM-003-SSA2-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, que a la letra dice:⁽¹⁰⁾

“Apartado 4.5.

La venopunción para recolectar sangre por extracción simple, o algún componente sanguíneo mediante aféresis, deberá hacerse en áreas cutáneas libre de lesiones y se realizará después de su limpieza y antisepsis cuidadosas.”

“Apartado 5.3.7.

Sujetos que en los últimos dos años, tengan antecedentes de dos o más infecciones bacterianas, entre los siguientes:

- Septicemia
- Neumonía
- Meningitis
- Absceso cerebral”

“Apartado 10.25.

En caso de que el banco de sangre o el servicio de transfusión detecte o sea notificado de una reacción transfusional posiblemente secundaria a contaminación bacteriana de una unidad de sangre o de sus componentes, deberá enviar la unidad implicada junto con una muestra del receptor para bacterioscopía y cultivo. En este caso y de haberse preparado más de un componente a partir de la misma unidad, se evitará la utilización de éstos hasta comprobar la ausencia de contaminación.”

“Apartado 12.3. Inciso e)

En la selección de candidatos para transfusión autóloga mediante depósito previo, se deberá hacer una valoración que permita excluir a los que tengan cualquiera de lo siguiente:

- “Infecciones agudas o bacteremia”

“Apartado 13.6.1 Inciso f)

Los candidatos a hemodilución preoperatoria aguda, se someterán a una valoración cuidadosa, con frecuencia interdisciplinaria, que excluya del procedimiento al que tenga cualquiera de lo que a continuación se indica:

- “Bacteremia”

“Apartado 13.7.1 Inciso a)

Deberán excluirse de la práctica del rescate celular perioperatorio, los pacientes que se encuentren en cualquiera de los casos siguientes:

- “Los que cursen con bacteremia”

“Apartado 17.10.

De sospecharse una reacción por contaminación bacteriana, se enviará la unidad implicada al banco de sangre, o en su caso, al servicio de transfusión, junto con una muestra del receptor (obtenida en condiciones de esterilidad) y la etiqueta o formato a que se refiere el apartado C.12 de esta Norma, para que procedan las disposiciones que señala el apartado 10.25 de la misma.”

En el apéndice B está normado el control de calidad de equipos, reactivos y técnicas y en la cual se encuentra una tabla en la que hace mención sólo de hacer el control bacteriológico de la campana de flujo laminar. Pero fuera de esto no se indica un control bacteriológico de la sangre extraída y de ninguna de sus fracciones.

Apéndice B ⁽¹⁰⁾

EQUIPO	FORMA DE VERIFICACIÓN	PERIODICIDAD
Campana de flujo laminar	Control bacteriológico	Cada seis meses

CONTROL BACTERIOLÓGICO EN OTROS PAÍSES

En la literatura internacional hay referencia en varios países de: tipo de bacterias y frecuencia. (Véase Figura a)

PAÍS	TIPO DE BACTERIA	FRECUENCIA
Bélgica ⁽¹¹⁾	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Staphylococcus capitis</i> - <i>Propionibacterium acnes</i> 	1.4%
Canadá ^(12,13)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Micrococcus spp.</i> - <i>Corynebacterium spp.</i> - <i>Propionibacterium spp.</i> - <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Yersinia enterocolítica</i> - <i>Prevotella loescheii</i> - <i>Streptococcus del grupo G</i> 	0.04%
Estados Unidos de Norteamérica ⁽¹⁴⁾	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Bacillus cereus</i> 	0.19%
Estados Unidos de Norteamérica ⁽¹⁵⁾	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Difteroides</i> 	1.04%

Figura a. Frecuencia y microorganismos encontrados en diferentes países

2.2. HISTORIA DE LA CONTAMINACIÓN Y LA RECOLECCIÓN DE SANGRE

En la década de los 50's y anteriores, cuando la sangre era colectada por un sistema abierto en botellas de vidrio, la contaminación bacteriana fue un peligro serio de la transfusión sanguínea, con índices de contaminación de 2.4-4.5%. Desde la introducción de sistemas cerrados de bolsas de plástico estériles e interconectadas para la colección de sangre y su procesamiento, las complicaciones de las transfusiones con sepsis han sido significativamente reducidas. Pero la sepsis asociada a la transfusión aún es causa significativa de mortalidad y morbilidad. Mientras que en algunos artículos se informa que la incidencia es baja para la sepsis bacteriana en otros indica que es un problema y un peligro bastante serio. La frecuencia de contaminación bacteriana de derivados de Sangre Total (S.T.), y Concentrado Plaquetario por Aféresis (C.P.A.) de componentes sanguíneos se informa que es entre 0.04 y 2%, lo cual sugiere que la transmisión de bacterias asociado a transfusión puede ser un gran problema más que de virus. Desde la implementación de programas efectivos para reducir la contaminación de los virus llevados por la sangre, la sepsis ahora constituye el mayor peligro de transfusión sanguínea. ^(16,17)

Las reacciones sépticas en receptores de productos de sangre contaminados con bacterias, particularmente plaquetas, se han reconocido como un problema serio por décadas. Se ha informado que de 1990 a 1998, la contaminación bacteriana de sangre se calculó de un 17% de todas las muertes reportadas de transfusión y en segundo lugar sólo para complicaciones hemolíticas en Estados Unidos de Norteamérica (U.S.A.). Desde principios de 1970, la seguridad microbiana de la sangre se ha concentrado sobre el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La frecuencia de sepsis de pacientes atribuibles a transfusión por contaminación bacteriana de componentes sanguíneos es similar ó menor que la infección del virus de la hepatitis C asociada a transfusión la cual es transmitida en aproximadamente 1 de 2,000 a 6,000 unidades probadas y la cual es frecuentemente asintomática. Esto es significativamente mayor para la infección con los virus de la inmunodeficiencia humana y hepatitis B, de los cuales se informa la posibilidad de transmisión de 1 en 225,000 y 1 en 200,000 de todas las unidades probadas, respectivamente. En 2002, cinco médicos de medicina transfusional conjuntamente señalaron y cuestionaron una llamada pública para la comunidad que colecta sangre para adoptar métodos de detección para contaminación bacteriana de plaquetas. En el mismo año, el Colegio Americano de Patólogos del Programa de Acreditación de Laboratorio adicionó un requerimiento para probar la contaminación bacteriana. Lo que es más, en 2003, la AABB, incluyó un nuevo estándar en ésta 22ava., edición de Estándar para Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, lo cual requiere que desde Marzo de 2004, el banco de sangre ó servicio de transfusión debe implementar métodos para limitar y detectar contaminación bacteriana en todos los componentes de plaquetas. ^(18,19)

Las bacterias en el ambiente (especies de *Pseudomonas*, especies de *Flavobacterium* y especies de *Bacillus*) pueden llegar a entrar a los componentes sanguíneos a través de lesiones en minutos, durante la colección y proceso en sistemas cerrados.⁽²⁰⁾

Las propiedades de las bacterias en un componente de sangre infectado parece ser de importancia fundamental, en particular su capacidad para multiplicarse bajo las condiciones de almacenamiento, su patogenicidad en humanos, y su capacidad para formar toxinas.⁽²¹⁾

2.3. CONCENTRADO(S) PLAQUETARIO(S). (C.P.)

A principios de 1980, el almacenamiento de plaquetas por siete días fue aprobado en los U.S.A. Este almacenamiento de siete días estuvo basado en la función aceptable *in vitro*, su recuperación *in vivo* y datos de supervivencia⁽²²⁾, pero el tiempo fue reducido al actual de cinco días por el incremento del riesgo de proliferación bacteriana. Informes recientes de Europa han abogado por el uso de cultivos bacterianos de plaquetas en el segundo ó tercer día de almacenamiento para extender la vida media de las plaquetas a siete días. Tal estrategia se considera costo-efectiva.⁽²³⁾

Según la NOM-003-SSA2-1993 aquí en México si el C.P., es obtenido por fraccionamiento de sangre fresca su vigencia máxima a partir de la recolección es de 24 a 72 hs, y el C.P.A., de 24 hs, a cinco días.⁽¹⁰⁾

De ahí que entre más tiempo de vida pase para un C.P., es más probable que este pueda estar contaminado y sea un factor de riesgo para las reacciones sépticas de la transfusión.⁽¹⁶⁾

Además el tipo de plástico de polímero usado para la manufactura de las bolsas donde se almacenan las plaquetas afecta la rapidez y extiende el crecimiento bacteriano.

La incidencia de unidades plaquetarias contaminadas de donadores al azar ha sido reportado de aproximadamente 1 en 1000 a 3000 unidades plaquetarias.^(7,23)

El cultivo de 2188 unidades de plaquetas, puestos en grupos de ocho (pool) después de almacenarlas revelaron bacterias en más de 20% de pools; la frecuencia mínima de contaminación en unidades individuales fue calculado para ser de 2.4%.⁽²⁴⁾

Un C.P., preparado de un pool, ya sea de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) ó de Buffy-Coat (B.C.), implica un gran riesgo aproximadamente siete veces más un índice de contaminación alto en comparación con un solo donador de C.P.A.^(21, 24, 25,26)

Los C.P.A., son obtenidos por un proceso en el cual la S.T., del donador es obtenida con un anticoagulante y es separada por una centrifuga sofisticada; las células no deseadas (en este caso los eritrocitos y muchos leucocitos) y plasma son reinfundidos al donador; de hecho una unidad de C.P.A., es equivalente terapéuticamente a un pool de plaquetas de varios donadores, pero está es preparada de un solo donador.

Los índices de contaminación bacteriana y reacciones asociadas a sepsis son generalmente altas para componentes plaquetarios; estos son atribuibles a las condiciones de su almacenamiento para mantener la función plaquetaria: una temperatura de 20 a 24 °C, agitación continua, un ambiente aeróbico, y un período de almacenamiento a cinco días, durante la cual las bacterias alcanzan concentraciones de 10^7 a 10^9 UFC/mL. Estos factores

contribuyen al índice en el incremento de reacciones sépticas, particularmente cuando son componentes viejos y estos son transfundidos. ^(16,27)

La presentación clínica de las bacteremias asociadas a la transfusión de C.P., contaminados varía desde cuadros leves hasta el shock séptico y depende de factores en los que interfiere tanto el C.P., como el receptor. En los que depende el C.P., figuran la virulencia del microorganismo, el nivel de contaminación y el volumen transfundido. Los factores del receptor incluyen el estado inmunitario y si el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico en aquel momento. De hecho, es posible que los cuadros más leves pasen desapercibidos y sean atribuidos a una Reacción Transfusional Febril No Hemolítica (RTFNH). ⁽²⁸⁾

Muchas de las bacterias implicadas en la contaminación bacteriana de C.P., y C.P.A., son parte de la biota nativa de la piel como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, *Propionibacterium acnes*, difteroides, cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Herellea*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium*; además de la *Enterobacter (Aerobacter) cloacae*. Las bacterias recobradas aumentan progresivamente con el incremento del tiempo de almacenamiento. ⁽²⁾

En un estudio se encontró que las bacterias que se pueden pensar que son clínica y significativamente contaminantes de plaquetas puede ser detectadas de 9.2 a 25.6 horas cuando la concentración es de aproximadamente 10 a 100 UFC/mL. ⁽²²⁾

La presencia de folículos de pelo y las glándulas sebáceas de la piel; áreas de “hoyuelos” ó cicatrices en la fosa antecubital; el hecho de que la capa profunda de la piel no puede ser completamente desinfectada; supone que, hasta con una excelente técnica aséptica, no se puede completamente asegurar la venopunción estéril y debido a esto la incidencia de sepsis de transfusiones plaquetarias ha ido en incremento. ^(24,29)

Los estudios de crecimiento de contaminantes representativos de plaquetas (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus epidermidis*) han mostrado que los cultivos del segundo ó tercer día detecta la enorme mayoría de plaquetas contaminadas. Los cultivos en el día cero (día de la colección) ó día uno frecuentemente tiene bajas concentraciones de bacterias que pueden no ser detectadas por el cultivo. La implementación del cultivo en el segundo ó tercer día (con dos días de tiempo de incubación) puede permitir la extensión de la vida media de las plaquetas, esto en un estudio que realizó Blajchman y colaboradores, en donde además puede detectarse la mayoría de la contaminación de los C.P. ^(22,23)

De hecho desde 1987 a 1991, 19 fatalidades debido a contaminación bacteriana de plaquetas fueron reportados a la Food and Drug Administration (FDA). ⁽³⁰⁾

La presencia de organismos Gram negativos, tales como las *Enterobacter*, es difícil de explicar, ya que ellos no constituyen biota nativa de la piel en el brazo y sugiere una autocontaminación de la piel o una ruptura de la técnica estéril. Las pruebas de cualquiera de esto no han sido encontradas. ⁽²⁴⁾

La detección de *Propionibacterium acnes*, la cual puede ocasionalmente ser aislada de los C.P., tiene un crecimiento pobre en el ambiente aeróbico de almacenamiento de plaquetas.⁽²³⁾

Esta bacteria está presente en la piel normal y puede ser encontrada en C.P., con una incidencia de 1-4%. Y carecen de significancia clínica en el contexto con la transfusión plaquetaria.⁽³¹⁾ Además de que toma considerablemente mucho tiempo para su detección (en botellas aeróbicas o anaeróbicas).⁽²²⁾

Varias técnicas han sido sugeridas para examinar C.P., por contaminación bacteriana, pero ninguna ha recibido aceptación general, por la falta de sensibilidad, su no especificidad, el tiempo personal requerido, el gasto y la falta de una prueba aprobada.⁽²²⁾

En otro estudio se sugiere que el almacenamiento a 4 °C no permite la proliferación, si la unidad es contaminada con bacterias. Es bien conocido que las temperaturas frías generalmente inhiben la proliferación bacteriana.

Una objeción teórica para el almacenamiento de plaquetas a temperatura ambiente es la posibilidad de la proliferación de microorganismos introducidos dentro del sistema durante la flebotomía ó la preparación de los componentes. La S.T., colectada tiene capacidad antibacteriana, antes de su almacenamiento; es decir cuando se mantiene a temperatura ambiente. El complemento, con o sin la ayuda de anticuerpos específicos presentes en el plasma de los donadores, puede matar las bacterias, ó éstas pueden ser fagocitadas por los leucocitos del donador.^(20,21)

2.4. PLASMA

El proceso de congelamiento es muy popular como prevención de microorganismos en crecimiento, el plasma fresco congelado (P.F.C.), y crioprecipitados son raramente reportados para causar muerte por contaminación bacteriana. Cuando estos se asocian a contaminación bacteriana, la causa es externa con la práctica de descongelamiento inseguro con la contaminación de los baños calientes, usualmente por *Pseudomonas*.⁽³²⁾

La abertura de el paquete de crioprecipitados y el P.F.C., puede quedar contaminado, si no es protegido por una bolsa plástica secundaria, durante el deshielo en baños de agua contaminados con *Pseudomonas* (e.g., *P. cepacia*, *P. aeruginosa*).⁽²⁰⁾

2.5. CONCENTRADO(S) ERITROCITARIO(S). (C.E.)

Las bolsas de los C.E., están menos contaminadas o no contaminadas por la depleción leucocitaria (leucorreducción), y por los filtros de depleción leucocitaria que son capaces de remover las bacterias por 2 vías: directamente y por la remoción de leucocitos que han ingerido las bacterias presentes.^(7,26)

La prevalencia de unidades de sangre contaminadas varía mucho dependiendo sí el sistema de colección que fue usado es abierto o cerrado; cuanto lleva la sangre de almacenada antes del muestreo, y la temperatura de incubación del material de cultivo.

Las bacterias psicrófilas se implican en casos de sepsis fatales seguidas de transfusión con sangre contaminada, principalmente con Gram negativos, organismos productores de endotoxinas. Estos organismos se encuentran en el suelo, agua y heces y crecen ligeramente a 4 u 8 °C., rápidamente de 25 a 30 °C y a menudo no todas a 37 °C. Muchos organismos aislados son capaces de usar el citrato como fuente de carbono. Los organismos probablemente entran en la unidad de sangre en pequeños números al tiempo de la colección y se multiplican muy bien de 1 a 6 °C comenzando después del tercer ó cuarto día de almacenamiento con niveles de peligro alcanzados después de 2 semanas de almacenamiento.⁽²⁹⁾

2.6. REQUERIMIENTOS PARA UNA PRUEBA IDEAL

La prueba ideal para la detección de contaminación bacteriana debe reunir ciertas características:

- 1- La prueba debe ser fácil de realizar requiriendo un mínimo de preparación especializada y que pueda implementarse sin que este interfiera en el trabajo del servicio de transfusión del hospital. Los resultados deben ser claros y fáciles de interpretar.
- 2- La prueba debe ser bastante sensible para detectar todas las unidades con un nivel significativamente clínico de contaminación. Este nivel no es actualmente conocido y varía probablemente; pero podría desearse una concentración de 10^4 UFC/mL. La prueba debe ser capaz de detectar todas las especies bacterianas significativas y pueda ser usada para todos los productos sanguíneos. Sin embargo, los resultados positivos de bacterias muertas, concentraciones clínicamente insignificantes, ó contaminación de la muestra no debe detectarse.
- 3- Que tenga una alta especificidad. Los resultados positivos pueden conducir a un descarte innecesario de productos sanguíneos escasos.
- 4- La prueba debe ser rápida, permitiendo ser realizada al tiempo en que el producto sanguíneo es requerido, sin retraso significativo en que este es emitido.
- 5- Finalmente, la prueba debe ser económica, requiriendo un mínimo de equipo especializado o personal adicional.^(27,33,34,35)

2.7. TÉCNICAS PARA DETECTAR CONTAMINACIÓN BACTERIANA

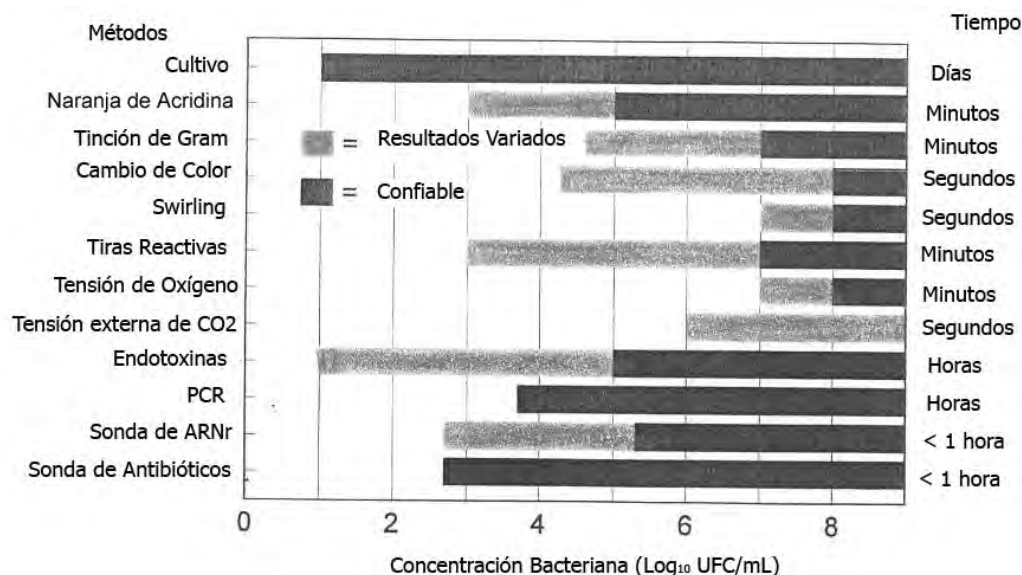


Figura b. Métodos de detección de contaminación bacteriana de productos sanguíneos. Límites aproximados de detección reflejados en la literatura. Las áreas grises sombreadas representan la concentración (UFC/mL) a las cuales, pero no todas, las bacterias son detectadas por cada método. Las áreas negras representan límites sobre la cual cada método es considerado confiable. Se muestra el tiempo aproximado de comienzo y fin de los ensayos. ⁽³³⁾

2.7.1. CULTIVO

Los sistemas automatizados de cultivos sanguíneos bacterianos satisfacen muchos de los requerimientos de una prueba ideal. Las técnicas de cultivo pueden detectar una amplia proporción de organismos a concentraciones tan bajas como un organismo por envase de cultivo inoculado, y son relativamente fáciles de usar. ⁽³⁵⁾

Desafortunadamente, a diferencia de la contaminación viral, el tiempo de muestreo es crucial. La concentración de contaminación bacteriana es inicialmente muy baja en productos sanguíneos y proliferan durante el período de almacenamiento.

Los falsos positivos pueden ocurrir debido a la simple contaminación que puede ocurrir durante el cultivo. Por consiguiente los cultivos bacterianos no son ni una prueba específica ni rápida. Las técnicas radiométricas son rápidas y más sensibles que los métodos tradicionales, pero son todavía pruebas extensas. ^(18,32)

Su sensibilidad es de 10 organismos/mL. ⁽³⁶⁾ Véase Figura b.

2.7.2. EXÁMENES MICROSCÓPICOS –NARANJA DE ACRIDINA Y TINCIÓN DE GRAM

Los exámenes microscópicos son baratos comparados con otros métodos de detección de contaminación bacteriana. Y se han usado en C.E., y C.P. Los microorganismos fueron detectados a una concentración de 10^4 a 10^8 UFC/mL, y en el mismo caso fue detectado a niveles tan bajos como 1 a 3×10^3 UFC/mL.

La tinción de naranja de acridina puede proveer mayor sensibilidad que la tinción de Gram pero requiere un caro microscopio de fluorescencia. ⁽¹⁸⁾

2.7.3. INSPECCIÓN VISUAL-CONCENTRADOS ERITROCITARIOS: CAMBIO DE COLOR

En casos de contaminación bacteriana de C.E., es conocido que el segmento del tubo adjunto casi siempre permanece estéril, pero si esto no sucede se podrán observar diferentes grados de hemólisis según que tan contaminado se encuentre el C.E., así como coágulos que pueden indicarnos la presencia de algún microorganismo. También el cambio de color puede observarse de morado oscuro a negro; además de coágulos en la bolsa. La multiplicación bacteriana puede causar que el oxígeno en una unidad de células rojas sea consumida, causando desaturación de la hemoglobina y oscurecimiento de la unidad cuando es comparada con el color de las células en los segmentos sellados adjuntos.

La sensibilidad de la identificación visual de contaminación bacteriana es de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Ésta prueba es atractiva porque es fácil, rápida, de bajo costo, y es de naturaleza no invasiva.

2.7.4. INSPECCIÓN VISUAL-CONCENTRADOS PLAQUETARIOS: SWIRLING

La evaluación de swirling plaquetario ha sido sugerido como una medida de control de calidad para asegurar la viabilidad plaquetaria. En esta técnica no invasiva, las plaquetas son expuestas a una fuente de luz y son invertidas. Las plaquetas con morfología discoide (asociadas con mejor viabilidad) reflejan la luz y produce el fenómeno de “remolino” ó “corriente”, mientras las no discoides, plaquetas esféricas no muestran este efecto. Varios factores que incluyen almacenamiento prolongado a 22 °C, bajo pH, baja temperatura, y la contaminación bacteriana afecta la viabilidad plaquetaria y el swirling. Los resultados del metabolismo bacteriano en un bajo pH, principalmente decrece en el efecto de “swirling”.

En un estudio que realizaron Wagner y Robinette observaron que las plaquetas contaminadas cesan el swirling a niveles bacterianos de 10^7 a 10^8 UFC/mL. ⁽³⁷⁾

Otros cambios en plaquetas contaminadas que pueden ser evidentes sobre la inspección visual incluyen coágulos pequeños y una luz color verde. ^(32, 33, 36)

2.7.5. MEDICIONES METABÓLICAS-TIRAS INDICADORAS MULTI-REACTIVOS

El crecimiento bacteriano típicamente resulta en el metabolismo de la glucosa y producción de ácido; por lo tanto, los productos sanguíneos contaminados pueden mostrar decremento en los niveles de glucosa y disminución de pH.

El método de la tira reactiva para la detección de contaminación bacteriana es particularmente atractiva, porque este puede ser al tiempo de poner en circulación el producto sanguíneo, y los resultados pueden ser viables rápidamente. Esto es simple para realizar y no es caro.

En general la sensibilidad es de 95% con una especificidad de 98% a 100% a 10^7 UFC/mL.

Pero una desventaja de este método es el anticoagulante usado y que algunas especies bacterianas tienen características metabólicas que pueden prevenir la disminución esperada del pH en la presencia de crecimiento bacteriano. ^(32, 33, 36)

2.7.6. MEDICIONES METABÓLICAS-ANÁLISIS DE GAS SANGUÍNEO

El metabolismo de bacterias proliferativas en productos sanguíneos conducen a cambios predecibles en la pO_2 y en la pCO_2 .

Las plaquetas también producen CO_2 y esto complica los intentos para detectar contaminación bacteriana por mediciones de este analito.

El análisis del gas sanguíneo es rápido, la manera no cara de detectar contaminación bacteriana grave. Sin embargo, este método está afectado por el intercambio de gases con el medio ambiente, el cual es una función de la permeabilidad del gas de la bolsa de plástico de almacenamiento.

2.7.7. ENSAYOS DE ENDOTOXINAS

La medición de endotoxinas producidas por bacterias Gram negativas es otra manera de asegurar la contaminación de productos sanguíneos.

El límite bajo de detección bacteriana fue en el índice de 10^1 a 10^5 UFC/mL.

Este método es limitado para la detección de organismos que producen endotoxinas tales como *Yersinia enterocolitica*.

2.7.8. TÉCNICAS DE ADN/ARN. (Ácido desoxirriboucleico/Ácido ribonucleico)

En un estudio realizado por Feng y colaboradores, investigaron el uso de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) en la detección de *Yersinia enterocolitica* en sangre total. Este método es capaz para detectar tan poco como 500 organismos por $100\mu L$ de sangre (5×10^3 UFC/mL). Este ensayo requiere 6 horas para realizarse y es capaz de detectar sólo un organismo. Este método también puede ser susceptible para problemas con contaminación y resultados falsos positivos. ^(32,33)

2.8. CARACTERÍSTICAS DE LAS REACCIONES SÉPTICAS TRANSFUSIONALES

La presencia de una reacción séptica transfusional puede ser considerada cuando uno de los siguientes signos ó síntomas ocurran en un receptor de algún producto sanguíneo durante ó dentro de las dos horas de una transfusión.

- 1- La presencia de fiebre ($38.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más), ó el ascenso en la temperatura del receptor $\geq 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ del valor pretransfusional.
- 2- El comienzo de escalofríos.
- 3- Una taquicardia definida como una frecuencia cardíaca de 120/mín, ó un incremento en la frecuencia cardíaca de ≥ 30 mín del valor basal.
- 4- Una presión sistólica de ≥ 30 mm de mercurio.
- 5- Otros síntomas incluyendo: náusea, vómito, diarrea, disnea, sangrado, oliguria y/ó un estado de choque.⁽³⁸⁾

Además de CID e insuficiencia renal.⁽³⁾

Sí la contaminación bacteriológica se sospecha, la transfusión debe finalizarse inmediatamente y realizarse una tinción de Gram y un cultivo de sangre tanto de la unidad como del receptor tan rápidamente como sea posible después de que la reacción sea observada.

La sangre del paciente, el componente sospechoso, y la solución intravenosa en toda la línea de administración usada debe cultivarse para organismos aeróbicos y anaeróbicos a varias temperaturas.

El manejo de la reacción es, en primera instancia, detener la transfusión seguido por terapia con antibióticos, líquidos, electrolitos y fármacos vasopresores para controlar el estado de choque.^(29, 39, 40)

2.9. CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS CRIOPRESERVADAS (C.P.H.)

La transfusión de Células Progenitoras de la Sangre Periférica autóloga (CPSP), puede ser usada como un tratamiento de soporte en pacientes de hematología y oncología después de radiaciones o quimioterapias absolutas. Antes del tratamiento los pacientes con cáncer reciben un factor de estimulación para liberar células madre de la médula dentro de la sangre periférica. Las CPSP son rutinariamente cosechadas, procesadas, y criopreservadas con el propósito de la reconstitución de la médula. Las células madre se encuentran en la fracción de células mononucleares de células blancas. Está fracción es también rica en otras células blancas, porque este tipo de células tienen cerca la misma densidad. Las CPSP procesadas involucran un número de manipulaciones asépticas, reportadas en la literatura, el índice es de 0 a 17%. Esto demuestra que a pesar de todas las precauciones tomadas la contaminación microbiana no puede ser excluida completamente. La contaminación microbiológica de CPSP de autoinjerto puede ocurrir durante el procedimiento de separación, durante la manipulación

ex vivo antes de la criopreservación y descongelamiento en un baño de agua justo antes de la reinfusión. El origen de la contaminación puede ser un donador con bacteremia asintomático o no asintomático, o un fracaso de mantenimiento aséptico durante la colección de sangre, su procesamiento, y/o criopreservación; y los datos sugieren que las estrategias para monitorear y prevenir contaminación puede y debe ser implementado en cada uno de estos pasos. Sin embargo, en un estudio, en el Banco de Sangre de Stichting Rode Kruis Noord Holanda cada serie de CPSP es rutinariamente probada por contaminación microbiana. ^(41,42)

La notificación de un cultivo positivo antes de la infusión puede sólo ocurrir cuando el componente ha sido criopreservado.

En un estudio se demostró que hay un 4.5% de incidencia de contaminación de autoinjerto de CPSP por biota nativa de la piel común o microorganismos del medio ambiente. Está es la misma evidencia de los microorganismos Gram negativos que pueden sobrevivir en refrigeración mostrando crecimiento substancial durante incluso períodos cortos de almacenamiento. Esto se encontró en contraste con las bacterias Gram positivas las cuales sobreviven a una mala incubación fría. Por consiguiente, al parecer es probable que los cultivos de las especies de *Bacillus* y *Staphylococcus* coagulasa negativos de los autoinjertos de CPSP no sobrevivieron el procedimiento de coagulación. Es importante hacer notar que la médula ósea y otros productos sanguíneos poseen actividad bactericida. Hay infección evidente del catéter de aféresis durante el procedimiento de separación y el procesamiento ex vivo del concentrado de células madre antes de la criopreservación. La contaminación debida a la colección no estéril y bolsas de criopreservación o la solución de dimetilsulfóxido no parece probable; pero el control de proceso debería incluir cultivos periódicos de los reactivos agregados a las células tallo. ⁽⁴³⁾

Tres posibles fuentes de contaminación bacteriana en CPSP pueden ser: 1) el donador curse con una bacteremia asintomática, 2) la colección de la médula y el proceso de filtración, y 3) las manipulaciones en el laboratorio. Lazarus y colaboradores, encontraron que en 7 de 13 cultivos positivos fueron posiblemente causados por la introducción de bacterias durante el proceso de descongelamiento en un baño de agua.

Raras veces el microorganismo contaminante puede ser demostrado por que el receptor puede estar cursando con una bacteremia. Esto puede ser debido a el bajo número de organismos presentes ó el que muchos pacientes se encuentran tomando antibióticos al mismo tiempo que se realiza la transfusión. Incluso aunque muchos de los microorganismos forman parte de la biota nativa de la piel; estos son capaces de causar infecciones en un paciente inmunocomprometido. ⁽⁴⁴⁾

2.10. GENERALIDADES DEL Bact/Alert®

Los cultivos bacterianos tienen alta sensibilidad pero los métodos tradicionales son demasiado lentos para ser prácticos. La nueva tecnología está basada en el continuo monitoreo de la producción de CO₂ en botellas de cultivo especialmente diseñadas para este fin. Este es

altamente sensible, específico, ahorra trabajo y tiene rapidez suficiente para liberar productos 3 días después de la colección. ⁽¹⁶⁾

En el Banco de Sangre de Stichting Rode Kruis Noord Holanda, este sistema de cultivo automatizado es usado para el examen de componentes sanguíneos. El sistema es muy satisfactorio para la determinación de contaminación microbiana en los componentes estándar del banco de sangre. Sin embargo, se han obtenido resultados falsos positivos debido a la producción de dióxido de carbono por leucocitos. Basados en estudios pilotos con B.C., se sabe que los leucocitos (a través de su continuo metabolismo) producen dióxido de carbono, el cual causa estos resultados falsos positivos. ⁽⁴¹⁾

En otro estudio se proporcionan datos que indican que las botellas pediátricas son las botellas preferidas para cultivo aeróbico, detectando crecimiento en 100% de tales cultivos y que hasta en algunos haya crecimientos de organismos anaeróbicos. Las botellas pediátricas usadas en este estudio fueron inoculadas con 2 mL comparadas con los 4 mL para los otros tipos de botellas. Es importante hacer notar que se encontraron problemas con la tinción de Gram con las botellas tanto aeróbicos y anaeróbicos debido a la coloración oscura del carbón activado usado para absorber antibióticos.

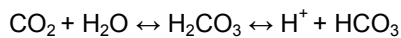
Todos los organismos pueden ser detectados en un tiempo razonable con el uso sólo de botellas de aerobios. ⁽²²⁾

Para muchas de las bacterias, el BacT/Alert[®] produce una señal positiva dentro de 62 horas, sólo las especies de *Propionibacterium* fue una excepción, con una señal positiva usualmente después de cuatro a seis días. ⁽⁶⁾

Un factor crítico en el análisis de C.P., es el tiempo de muestreo. Wagner y Robinette en su evaluación del sistema BacT/Alert[®] concluyeron que el tiempo de muestreo de 24 hs., o más post-preparación puede ser necesario para proveer la confianza de detectar a *E. coli* y *S. epidermidis*. Blajchman y colaboradores, realizaron un estudio prospectivo usando un sistema de cultivo de sangre automatizado en el cual las unidades plaquetarias se estudiaron en el día uno y también en el día tres. Sobre los días uno y tres, cuatro unidades fueron encontradas para ser positivas en el día tres solamente. Esto suministra evidencia de que se requiere un período de incubación es requerido antes del muestreo, con el propósito de incrementar la probabilidad de la detección, se reduce potencialmente el tiempo de incubación de las botellas inoculadas. En este estudio, el sistema BacT/Alert[®] detecta inóculos con una concentración de 10 UFC/mL⁻¹ ó más. Teóricamente el sistema puede detectar un organismo viable dentro de la botella de cultivo inoculada BacT/Alert[®]. Este estudio valida el sistema de detección microbiana BacT/Alert[®] para el escrutinio de C.P. El sistema BacT/Alert[®] da un equivalente o tiempo de detección reducido comparado con el sistema de caldo tioglicolato, con la excepción de *Propionibacterium acnes*. El BacT/Alert[®] fue capaz de detectar un índice de organismos al nivel del inóculo de 10 y 100 UFC/mL⁻¹. Es una opción que considera serias ventajas como parte de posibles estrategias para reducir significativamente la transmisión bacteriana por transfusión. ⁽⁴⁵⁾

2.10.1. FUNDAMENTO DEL BacT/Alert®

El medio de las botellas utilizado en el sistema BacT/Alert®, es un medio basado en un caldo de soya tripticaseína, que está suplementado con aminoácidos complejos y carbohidratos donde se llevará a cabo el crecimiento y además asegurará la producción óptima de CO₂. Contienen 30 mL de medio y 0.035% de polianetolsulfonato de sodio como un anticoagulante. Las botellas cuentan con un sensor de CO₂ que se adhiere al botón del fondo y es separado del medio por una membrana semipermeable. La membrana es impermeable a muchos iones, incluyendo iones hidrógeno, y a componentes del medio, así como a la degradación de la sangre. Este es casi impermeable al agua pero es libremente permeable al CO₂. El dióxido de carbono producido por el crecimiento de organismos difunden de un lado a otro de la membrana dentro del sensor y se disuelve en el agua, dando la siguiente ecuación de reacción:



Los iones hidrógeno libres pueden interactuar con el sensor, el cual vira de azul a verde oscuro en el estado alcalino. Como el CO₂ es producido y disuelto en el agua, la concentración de los iones hidrógeno incrementa y el pH decrece. Esto causa que el sensor se haga ligeramente verde y eventualmente amarillo, lo cual resulta en un incremento de la luz roja reflejada por el sensor.

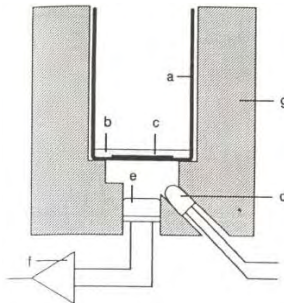


Figura c. Vista del esquema de la botella y del detector de CO₂ del BacT/Alert®. a. Pared de la botella; b. membrana; c. sensor de CO₂; d. diodo que emite la luz; e. fotodiodo; f. amplificador; g. bloque

El prototipo del sistema BacT/Alert® es un incubador autocontenido (la temperatura puede ser ajustada entre 35 y 37 °C ± 0.5 °C), agitador y detector. Dentro del instrumento hay 11 bloques, cada uno contiene 48 pozos. Los bloques, suspendidos cada uno balancea continuamente a una velocidad de 60 rpm. Cada pozo contiene un detector colorimétrico. El detector consiste en una luz emitida por un diodo y una luz roja absorbida por un fotodiodo. La luz emitida por el diodo es reflejada al sensor del fotodiodo, el cual produce una señal proporcional de voltaje a la

intensidad de la luz reflejada y la concentración de CO₂ en la botella. Después de la amplificación y filtro, las señales de voltaje son digitalizados y transmitidas a una microcomputadora para su análisis. Véase Figura c.

La monitorización ininterrumpida del BacT/Alert® para la producción de CO₂ en cada botella es de 144 veces al día cada 10 minutos. Los puntos de los datos son trazados como unidades de reflectancia versus tiempo y resulta en una curva de crecimiento. El algoritmo para la detección del crecimiento está basado en un análisis de la velocidad del cambio de la concentración de CO₂ en cada botella. Por consiguiente, la concentración de CO₂ en cada botella está comparada con lecturas anteriores de la misma botella en vez de utilizar un valor límite predeterminado de CO₂. Es decir:

- 1- Producción inicial de CO₂.
- 2- El incremento de CO₂ durante la fase de crecimiento microbiano.
- 3- Nivel total de CO₂ producido al final del ensayo.

Las botellas son anotadas dentro del sistema para ingresar el número de la muestra y la identificación del paciente dentro de la computadora. La computadora muestra entonces rápido el lugar de uso de las botellas dentro del pozo asignado. Estos pozos son también identificados por la iluminación de una pequeña luz verde adyacente para cada pozo. Después las botellas son situadas en los pozos y la computadora registra cuando estas son colocadas en el instrumento.

Cuando un incremento en la concentración de CO₂ es detectada en una botella, la luz adyacente del pozo es iluminada y la computadora imprime el número adyacente, la identificación del paciente, el número de pozo, el tiempo del crecimiento en que fue detectado (por ejemplo: cuando la botella se hace positiva), y el tiempo de positividad. Aparece un aviso en la pantalla de la computadora, se produce una alarma audible y una luz de aviso se ilumina en el panel del incubador. Después la botella es removida del instrumento y el pozo puede también ser usado para nuevos cultivos. Las botellas falsas positivas (botellas señaladas como positivas pero negativas en el frotis con tinción de Gram), pueden ser retornadas al sistema para una incubación y prueba adicional. Las botellas que no se hacen positivas continúan en el sistema por 7 días. Después de 7 días, la computadora imprime una lista de las botellas negativas e ilumina la luz adyacente para cada pozo que contiene una botella negativa. Estas botellas son removidas del sistema y descartada.



Figura d. Equipo automatizado BacT/Alert®

El BacT/Alert® fue diseñado para rapidez, precisión, y que sin fallar detecte microorganismos en la sangre y otros fluidos del cuerpo.⁽⁴⁶⁾ Véase Figura d.

3. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

¿La frecuencia y el tipo de contaminación bacteriana en los productos sanguíneos que se obtienen en el Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), será diferente del 0.04%? (Frecuencia menor encontrada en el universo total estudiado en otros países).

3.1. PLANTEAMIENTO ESPECÍFICO DEL PROBLEMA

Uno de los efectos adversos de la transfusión sanguínea es el de producir sepsis y quizá la muerte al receptor. Pero por desgracia cuando se produce una reacción adversa en este último sólo se le aplican medicamentos que contrarresten esta reacción y no se investiga a profundidad si es debida a una contaminación bacteriana o alguna causa inmunohematológica; es decir, no se le da la importancia necesaria.

Además de que hay ciertos componentes que se contaminan con mayor facilidad por las condiciones en que se obtienen (antisepsia adecuada), procesamiento (sistema cerrado y sistema abierto), y por último su almacenamiento (dependiendo del componente desde -80 °C hasta 22 °C).

Por tal motivo, debido a que en nuestro país no se han encontrado publicaciones acerca de la contaminación bacteriana en productos sanguíneos, se decidió investigar si la frecuencia es menor, igual ó mayor a la información que reportan los estudios realizados por otros países y proponer una metodología rápida y sensible para realizar el control de calidad de estos productos antes de que estos sean transfundidos, pues en la norma oficial mexicana para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos sólo se menciona someramente.

Luego entonces, ¿Cuál será la metodología para el control de calidad de las fracciones sanguíneas, que ayuden a disminuir el riesgo de transmisión de bacterias al receptor?

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y el tipo de contaminación bacteriana en los productos sanguíneos que se obtienen en el Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de México, D.F.

4.1. OBJETIVO PARTICULAR

Establecer una metodología basada en el sistema BacT/Alert® para el control de calidad de las fracciones sanguíneas para disminuir el riesgo de transmisión de bacterias al receptor.

5. HIPÓTESIS GENERAL

Sí, en informes internacionales la menor frecuencia de contaminación por bacterias en fracciones sanguíneas es de 0.04% y el tipo de bacterias son biota nativa de la piel y patógenos oportunistas; entonces, se espera encontrar una frecuencia similar y los mismos tipos de microorganismos en el Banco Central de Sangre de Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

5.1. HIPÓTESIS PARTICULAR

Sí, la metodología basada en el sistema BacT/Alert® para el control de calidad de las fracciones sanguíneas es sensible y rápida; entonces, ayudará a disminuir el riesgo de transmisión de bacterias al receptor.

6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

- Por la captación de la información: Prolectivo.
- Evolución del fenómeno en el tiempo: Transversal.
- Por la comparación de grupos: Descriptivo.
- Por la intervención del investigador: Descriptivo.
- Por la dirección del estudio: Causa a efecto.

7. VARIABLE DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE

VARIABLE DEPENDIENTE

Determinar la contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos de sistema cerrado y de sistema abierto.

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Obtención de los componentes sanguíneos.
- Procesamiento de los componentes sanguíneos.
- Almacenamiento de los componentes sanguíneos.

8. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Todos los donadores en protocolo.
- Componentes sanguíneos de sistema abierto y cerrado en protocolo.
- Productos caducados.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Baja por volumen insuficiente.
- Productos sanguíneos en sistema abierto accidentalmente.
- Concentrados eritrocitarios hemolisados.
- Concentrados eritrocitarios con coágulos.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Cultivos positivos contaminados en la resiembra.

9. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS

FRACCIONES SANGUÍNEAS

Sistema Cerrado

- Buffy Coat (B.C.)
- Concentrado Plaquetario (C.P.)
- Concentrado Plaquetario por Aféresis (C.P.A.)
- Concentrado Eritrocitario (C.E.)
- Concentrado Plaquetario Caducado (C.P.C.)
- Concentrado Eritrocitario Caducado (C.E.C.)

Sistema abierto

- Concentrados Eritrocitarios Filtrados con filtros de 4ª. generación (C.E.F.)
- Concentrados Plaquetarios Desplasmalizados (C.P.D.)
- Eritrocitos Opsonizados (OPSO)
- Pool de Crioprecipitados.
- Concentrados Eritrocitarios Lavados (C.E.L.)
- Células Progenitoras Hematopoyéticas Criopreservadas (C.P.H.)
- Reacciones Transfusionales (Rx.T.)
- Panel de células fenotípicamente conocidas para búsqueda de anticuerpos. (P)
- Concentrado Plaquetario por Aféresis Desplasmalizado (C.P.A.D.)

MEDIOS DE CULTIVO

- Botellas de cultivo sin carbón activado aerobias para sistema de microdetección microbiano automatizado Pedi-Bact[®] y/o SA[®] (Estándar)
- Agar Sangre de Carnero al 5%
- Agar Chocolate
- Agar Mac Conkey
- Pruebas bioquímicas comerciales para microorganismos Gram positivos (Api 20E[®])
- Pruebas bioquímicas comerciales para microorganismos Gram negativos (Api 20 A[®])
- Agar Muller-Hinton
- Agar Salmonella-Shigela
- Plasma obtenido con citrato de sodio
- Slime

- Caldo Tioglicolato
- Caldo BHI
- Kligler
- Urea
- MIO
- NaCl
- VP
- TSI
- LIA
- Citrato
- Malonato
- Bilis-esculina
- Gelatina
- Fenilalanina
- O/F Glucosa
- Azúcares (Maltosa, Sorbitol, Arabinosa, Rafinosa, Malobiosa, Sacarosa, Lactosa, Glucosa, Manitol)
- Caldo nitrato

REACTIVOS

- Antisépticos (Isodine, Cloruro de Benzalconio y Alcohol al 70%)
- Desinfectantes (Fenol al 5%)
- Reactivos para tinción de Gram (Cristal Violeta, Alcohol:Acetona y Safranina)
- Peróxido de Hidrógeno
- Aceite Mineral
- Reactivo para producir anaerobiosis estricta
- Discos de Furazolidona
- Discos de Taxo A
- Tiras para Oxidasa

EQUIPOS

- Campana de Flujo Laminar
- Sistema de Detección Microbiano Automatizado BacT/Alert®
- Estufa para incubación a 37 °C y 42 °C

10. MÉTODO

Se tomaron muestras de los productos sanguíneos tanto del sistema cerrado como del sistema abierto, de la tubería segmentada (piloto) de la bolsa y este es sellado con el hematrón® (sistema de sellado eléctrico); para no abrir el sistema y evitar la contaminación con la entrada de aire.

La muestra fue de cinco mL, está se aspiró con una jeringa por medio de una parte desinfectada con isodine de la tubería segmentada; esta muestra fue inyectada por el tapón de goma desinfectado también con isodine, dentro de una botella de cultivo BacT/Alert® de tipo Pedi-Bact® ó SA® (Estándar), sin carbón activado, aeróbicas para sistema de microdetección microbiano automatizado (BacT/Alert®) conteniendo 40 mL de medio de cultivo y siendo ventiladas en condiciones de esterilidad estrictas en una campana de flujo laminar para minimizar la contaminación ambiental y accidental de la tubería segmentada y de los medios de cultivo.

Las botellas inoculadas se incubaron según los lineamientos de la casa comercial para hemocultivos; a saber, a 36 °C±2 y agitación continua por hasta siete días en el sistema de microdetección automatizado (BacT/Alert®).

Cuando el sistema de microdetección automatizado (BacT/Alert®), detectó un incremento de producción de CO₂ por el cambio de color del sensor causando un signo positivo estos se subcultivaron sobre placas de Agar Sangre de Carnero al 5%, Agar Chocolate y Agar Mac Conkey, y se realizó la tinción de Gram, para confirmar los resultados e identificar falsos positivos debido a errores del instrumento.

Para las botellas cultivadas que fueron negativas después de siete días de incubación en el instrumento, el contenido fue también subcultivado dentro de placas de Agar Sangre de Carnero al 5% e incubadas en una estufa a 36 °C por 24 y 48 hs, realizando también una tinción de Gram.

Sí el resultado fue positivo se procedió a aislar el microorganismo para su posterior identificación con las pruebas bioquímicas respectivas, tanto para Gram positivos como para Gram negativos.

10.1. DIAGRAMA DE FLUJO

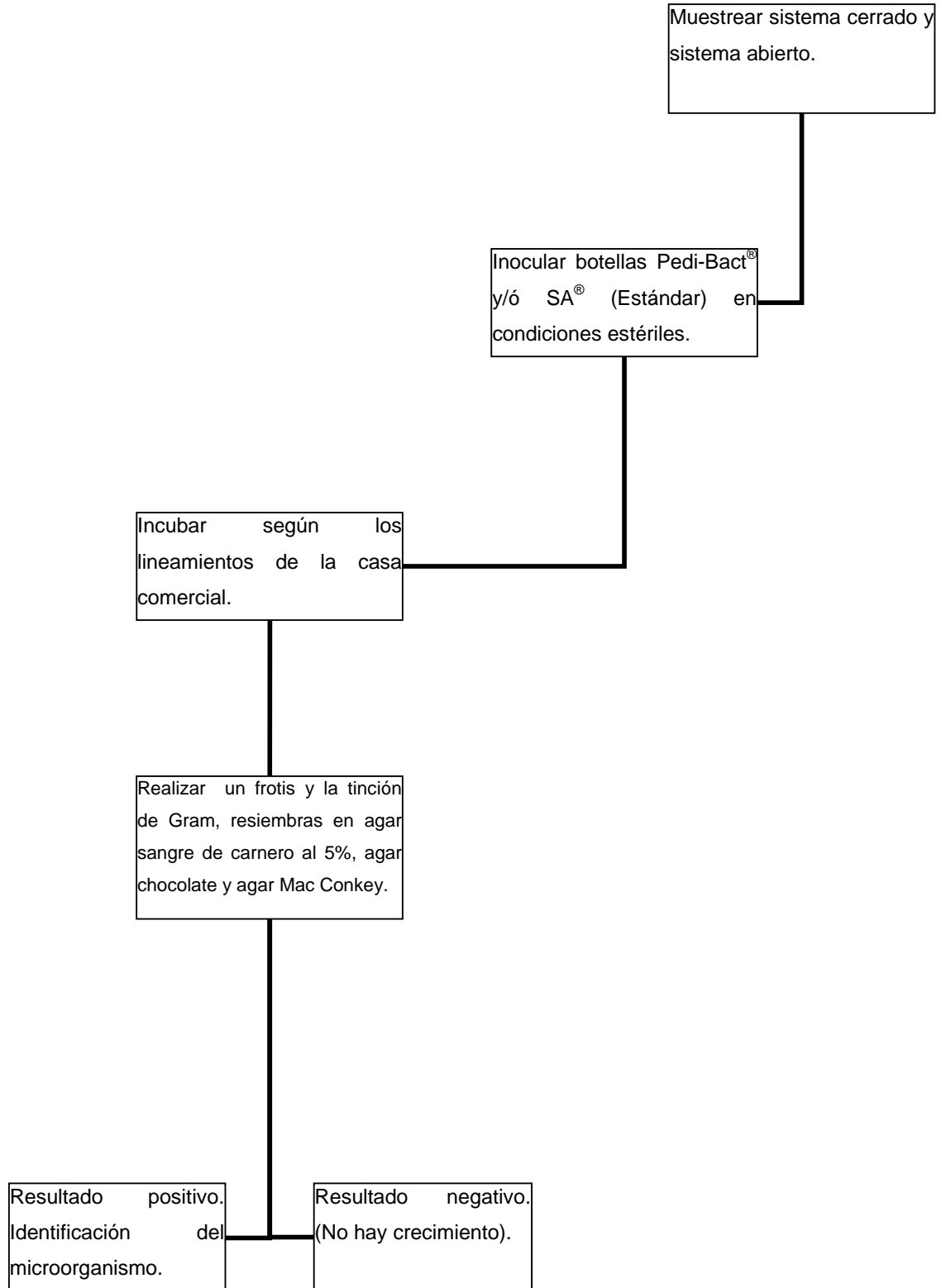


Tabla I. No. de muestras de sistema cerrado y sistema abierto para negativos, positivos y falsos positivos

	Sistema Cerrado No. de muestras (%)	Sistema Abierto No. de muestras (%)	Total No. de muestras (%)
Negativos	1339 (81.60%)	256 (15.60%)	1595 (97.20%)
Positivos	6 (0.36%)	14 (0.85%)	20 (1.22%)
Falsos Positivos	23 (1.40%)	3 (0.18%)	26 (1.58%)
Número de Muestras	1368 (83.36%)	273 (16.64%)	1641 (100%)

Tabla II. Productos sanguíneos probados con señales positivos en el BacT/Alert®, positivos confirmados por cultivo, falsos positivos y errores del instrumento.

Total Productos Sanguíneos Probados	Cantidad	Señales Positivas en el BacT/Alert® No. de muestras (%)	Positivos Confirmados por Cultivo No. de muestras (%)	Falsos Positivos No. de muestras (%)	Errores del Instrumento No. de muestras (%)
B.C.	131	7 (5.34)	0 (0)	7 (5.34)	4 (3.05)
C.P.	441	4 (0.68)	3 (0.68)	1 (0.23)	0 (0)
C.P.A.	427	17 (3.98)	2 (0.47)	15 (3.51)	3 (0.70)
OPSO	47	10 (21.28)	9 (19.15)	1 (2.13)	0 (0)
C.P.C.	33	1 (3.03)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)
P.	54	1 (3.03)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)
C.P.H.	74	4 (5.40)	3 (4.05)	1 (1.35)	1 (1.35)
C.P.D.	7	1 (14.28)	0 (0)	1 (14.28)	0 (0)
C.P.A.D.	4	1 (25)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Otros	423	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Total Productos Sanguíneos Probados	1641	46 (2.80)	20 (1.22)	26 (1.58)	8 (0.49)

Otros: C.E., C.E.C., Pool de Crioprecipitados, C.E.F., Rx. T., C.E.L.

Tabla III. Microorganismos encontrados en el sistema abierto

SISTEMA ABIERTO N=273

<i>Componente Sanguíneo</i>	<i>Microorganismos Encontrados</i>	<i>Frecuencia Absoluta</i>
OPSO	<i>Propionibacterium acnes</i>	3
	<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	4
	<i>Bacillus sp.</i>	2
C.P.H.	<i>Micrococcus sp.</i>	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
P.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1
C.P.A.D.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1
TOTAL		14

Tabla IV. Microorganismos encontrados en el sistema cerrado

SISTEMA CERRADO N=1368

Componente Sanguíneo	Microorganismos Encontrados	Frecuencia Absoluta
C.P.C.	<i>Bacillus sp.</i>	1
C.P.	<i>Micrococcus sp.</i>	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
C.P.A.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
TOTAL		6

Tabla V. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de contaminación bacteriana en productos sanguíneos.

Resultado de la prueba	Prueba positiva	Prueba negativa
Productos contaminados	a	b
Productos no contaminados	c	d

Donde: a= Verdadero positivo
 b= Falso negativo
 c= Falso positivo
 d= Verdadero negativo

Fórmulas para determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.

Sensibilidad (S)= $a/a+c$

Especificidad (E)= $d/b+d$

Valor Predictivo Positivo (VPP)= $a/a+b$

Valor Predictivo Negativo (VPN)= $d/c+d$

Tabla VI. Determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en las diferentes fracciones sanguíneas.

Componente Sanguíneo	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo (VPP)	Valor Predictivo Negativo (VPN)
B.C.	50%	94.66%	6.66%	99.59%
C.P.	100%	99.77%	75%	100%
C.P.A.	100%	96.47%	11.76%	100%
OPSO	100%	97.37%	90%	100%
C.P.C.	100%	100%	100%	100%
C.P.H.	100%	98.59%	75%	100%
P.	100%	100%	100%	100%
C.P.D.	50%	85.71%	33.33%	92.31%
C.P.A.D.	100%	100%	100%	100%

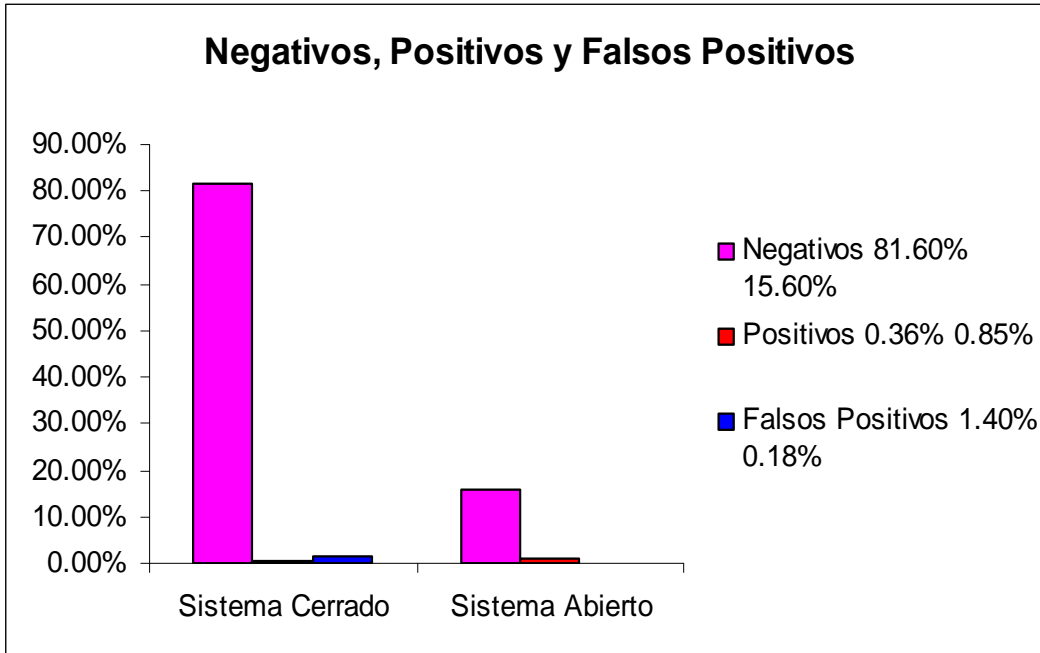


Figura 1. Comparación de los porcentajes de los resultados negativos, positivos y falsos positivos tanto del sistema cerrado como del sistema abierto.

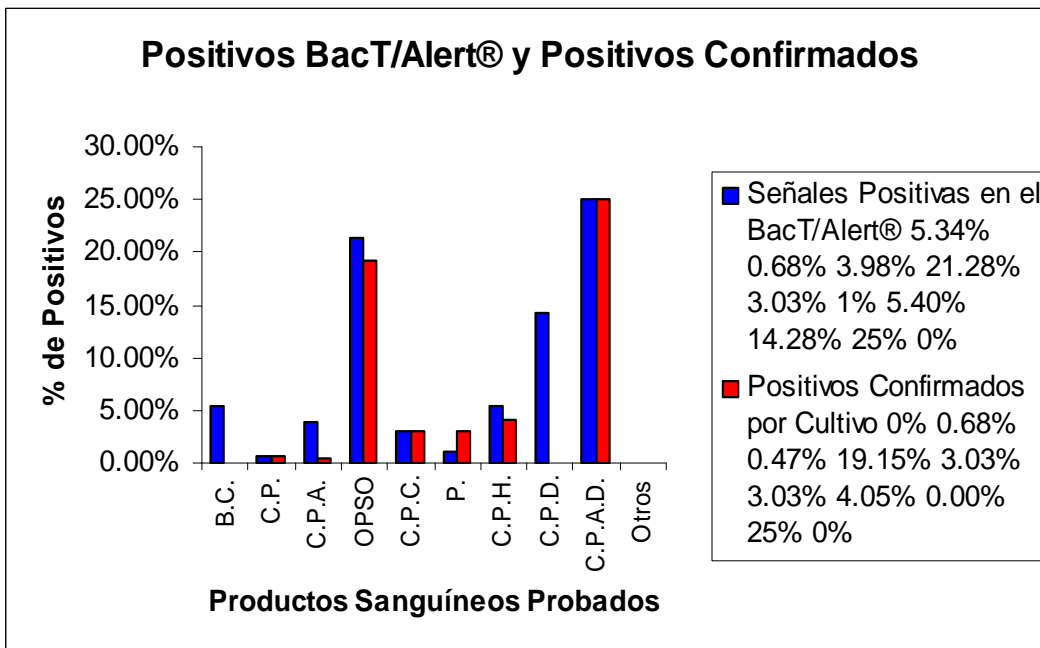


Figura 2. Relación entre los positivos del BacT/Alert® y los positivos confirmados.

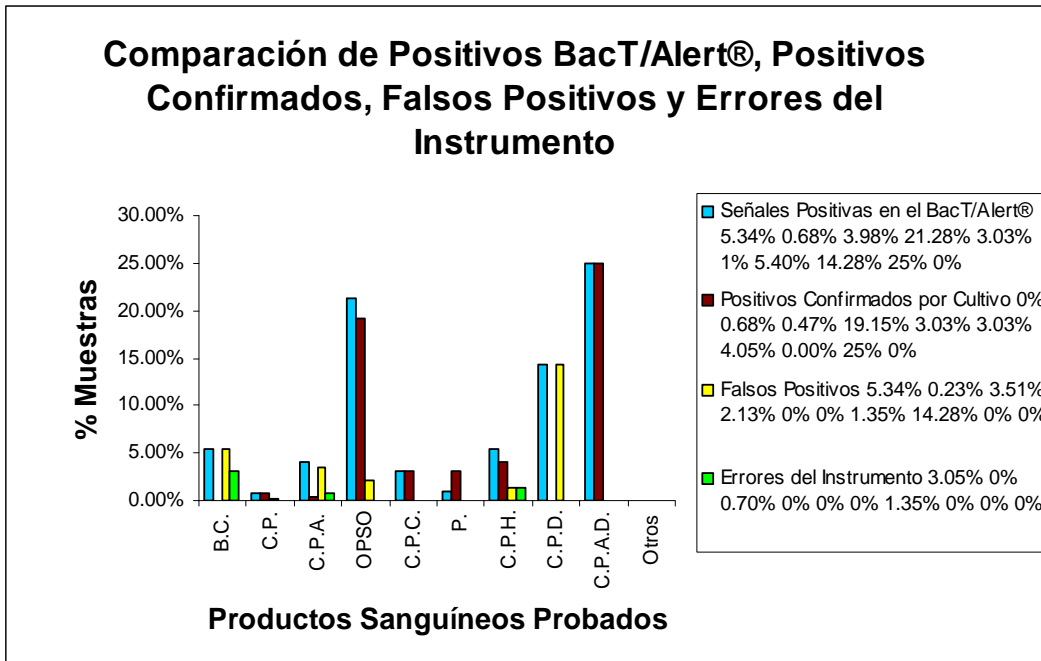


Figura 3. Comparación de positivos del BacT/Alert®, positivos confirmados, falsos positivos y errores del instrumento en los productos sanguíneos probados.

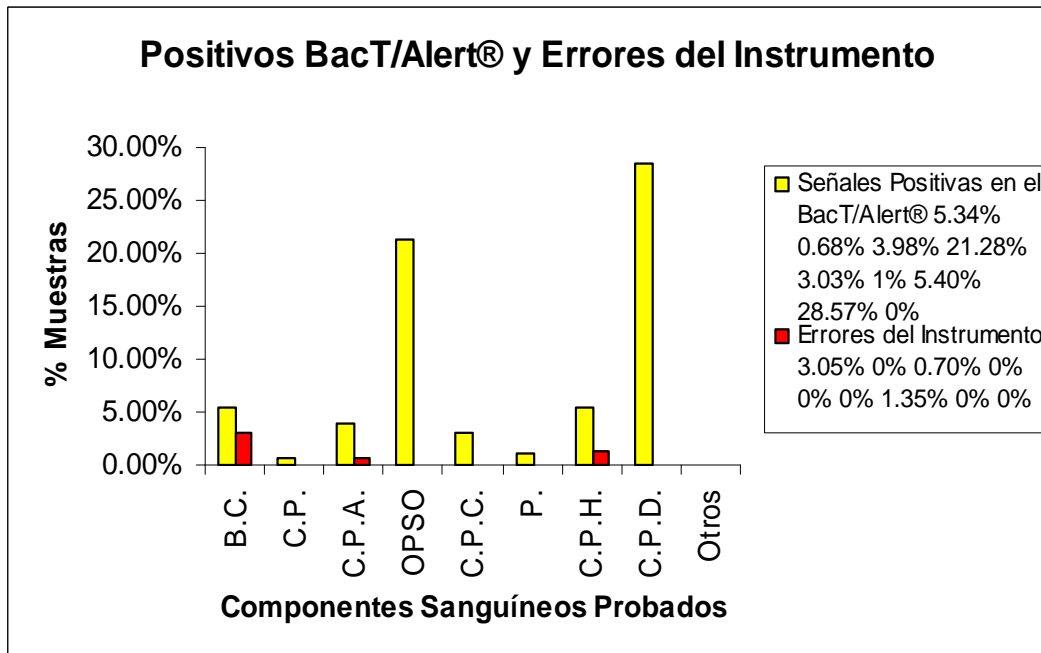


Figura 4. Diferencia entre los positivos del BacT/Alert® y los errores del instrumento.

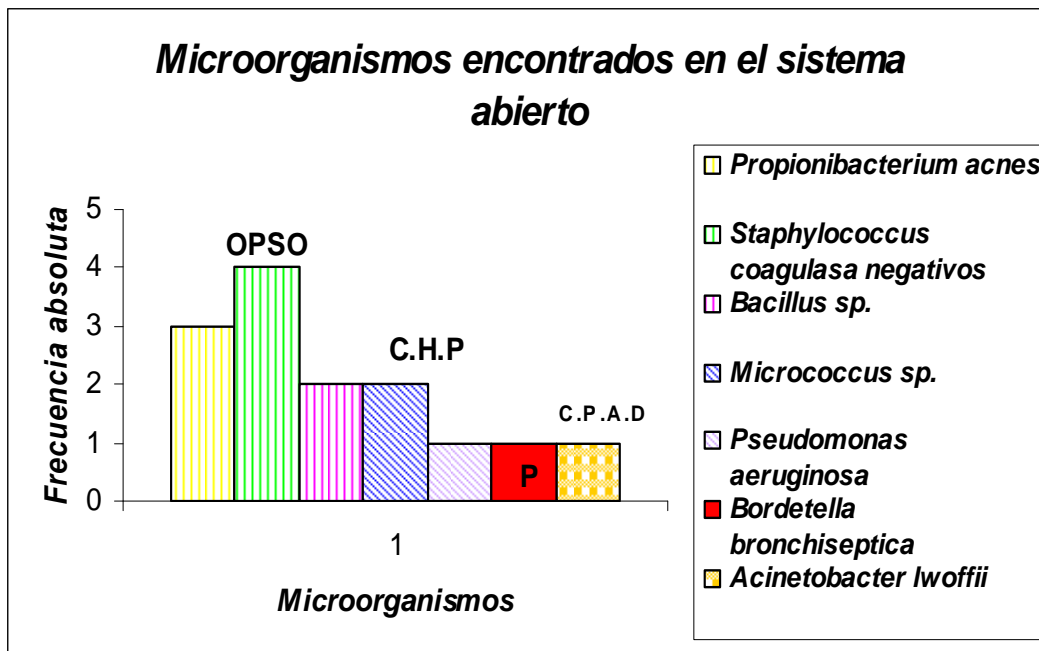


Figura 5. Frecuencia absoluta de los microorganismos encontrados en el sistema abierto.

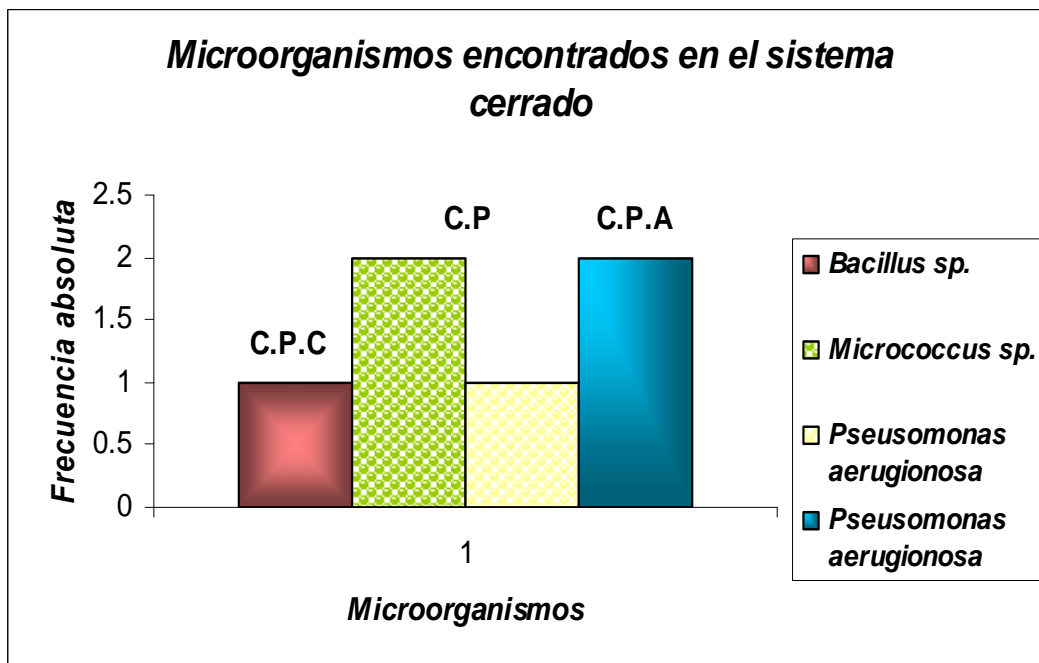


Figura 6. Frecuencia absoluta de los microorganismos encontrados en el sistema cerrado.

Número de muestra: 166F
Botella: !AQ9MSNS POSITIVO

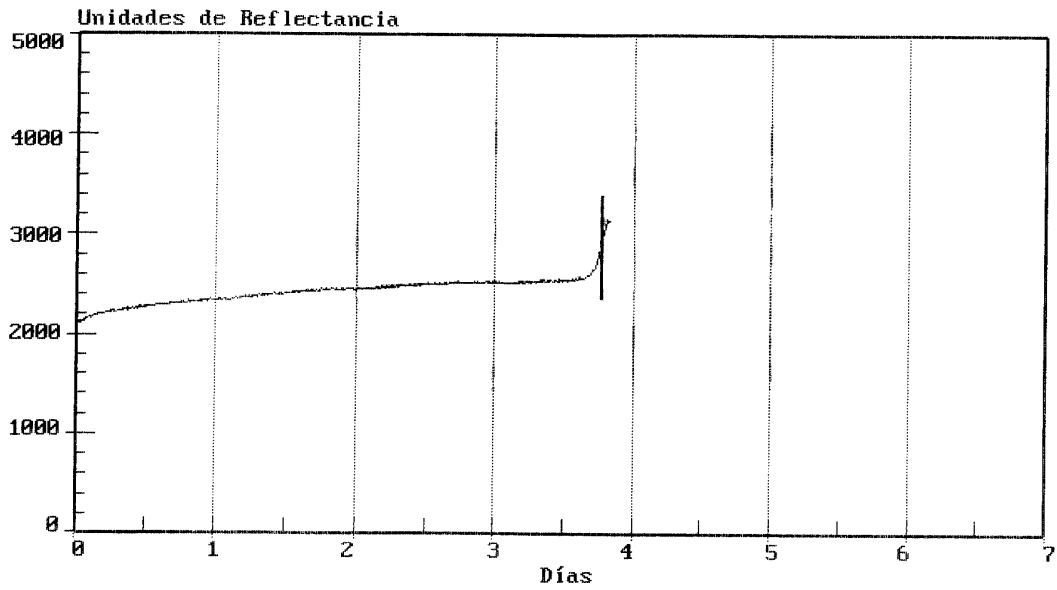


Figura 7. Gráfica de un verdadero positivo detectado por el BacT/Alert®.

Número de muestra: 428A
Botella: !AQCSKKP NEGATIVO

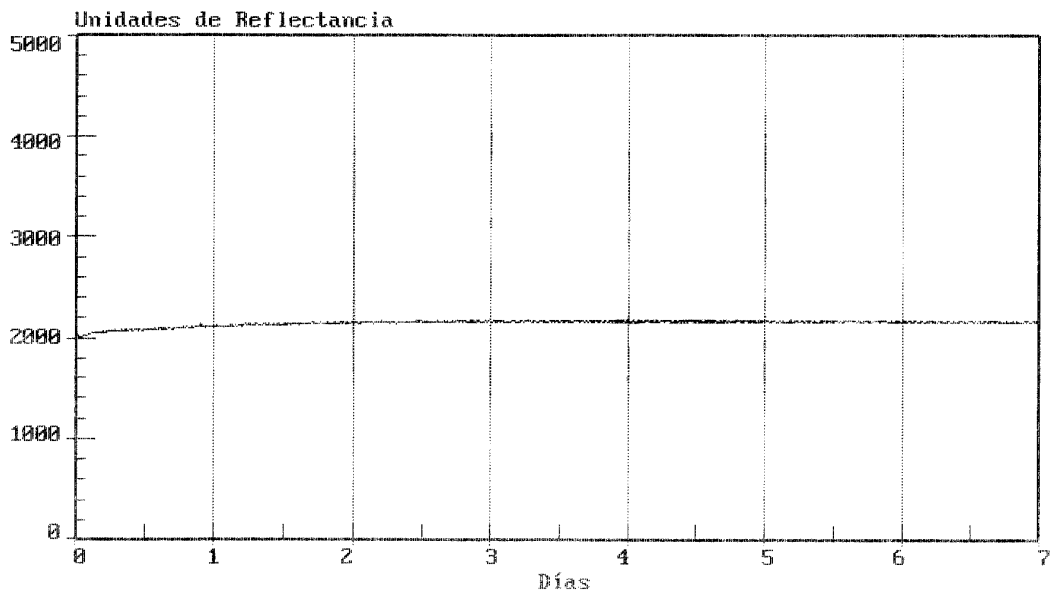


Figura 8. Gráfica de un negativo detectado por el BacT/Alert®.

Número de muestra: 91B
Botella: 1AQC5JG1 POSITIVO

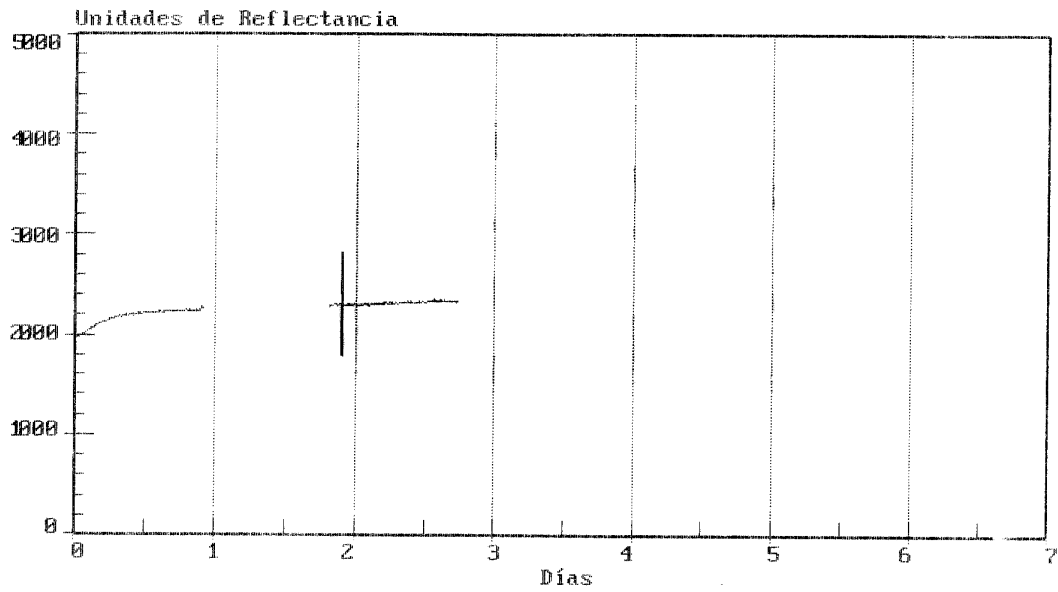


Figura 9. Gráfica de un falso positivo detectado por el BacT/Alert® (Error del instrumento).

Número de muestra: 282F
Botella: 1AQC5JQ4 POSITIVO

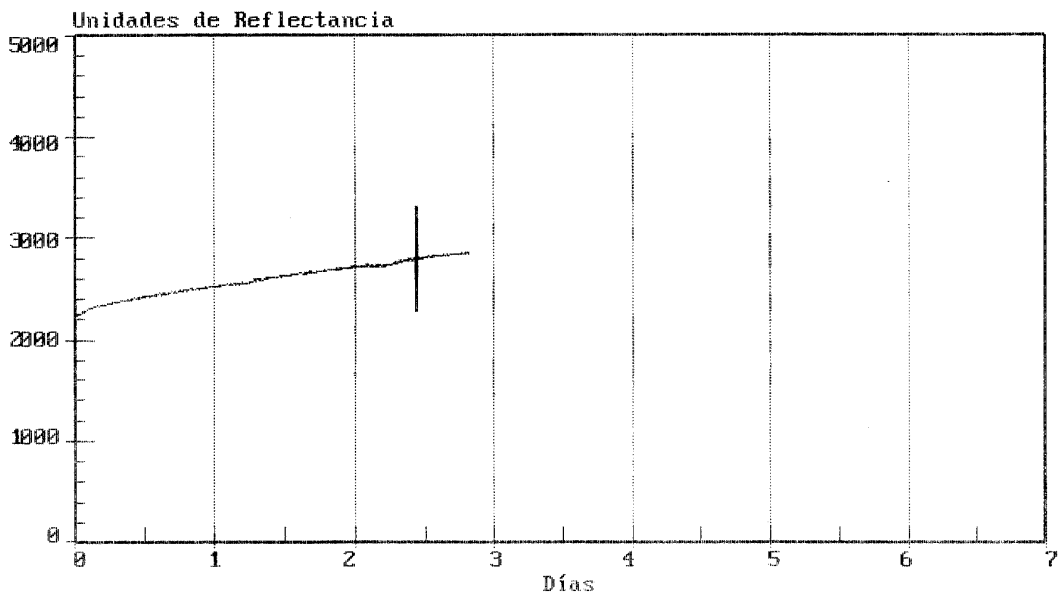


Figura 10. Gráfica de un falso positivo detectado por el BacT/Alert®.

11. DISCUSIÓN

De acuerdo al planteamiento del problema la frecuencia de contaminación y el tipo de esta última se encontró que:

En el sistema abierto hubo un 0.85% y en el sistema cerrado 0.36% (Véase Figura 1 y Tabla I); en comparación con lo encontrado en otros bancos de sangre del mundo, este es muy similar a ellos, pero comparado con el de la hipótesis (frecuencia menor encontrada), estas frecuencias son muy altas. En el sistema abierto es más alto el porcentaje que en el sistema cerrado, donde sabemos que al abrir el sistema este sufre más posibilidades de contaminarse si no se tienen los cuidados pertinentes en cuanto a el uso de técnicas asépticas; los componentes sanguíneos más contaminados fueron los OPSO, seguidas de las C.P.H., P., y por último los C.P.A.D. Véase Tabla III.

En cuanto a los microorganismos encontrados en este sistema fueron en su mayoría microorganismos de la biota nativa de la piel: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Micrococcus sp*; y algunas bacterias patógenas oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica* y *Acinetobacter Iwoffii*. *Propionibacterium acnes* (Véase Figura 5); fue uno de los microorganismos que estuvo frecuentemente presente en los componentes sanguíneos, este es un bacilo anaerobio y coloniza las glándulas sebáceas. Aunque los microorganismos de la biota nativa de la piel no necesariamente son patógenos, si se transfunde un componente sanguíneo contaminado a un paciente inmunosuprimido, aprovecharán esas condiciones para desarrollarse y podrían llegar a provocar la muerte; por eso la importancia de tener cuidado en la manipulación del sistema abierto. Se esperaría encontrar en este tipo de sistema a organismos propios contaminantes del ambiente o de superficies inanimadas; pero quizá algunos productos estaban ó contaminados desde la obtención del componente (venopunción), ó quizá no se utilizaron guantes para su manipulación, lo cual no pudo ser observado por los investigadores. Aunque el sistema abierto es más fácil que se contamine por la manipulación de éste, también lo es el sistema cerrado, por diferentes causas; en el sistema abierto se debe utilizar una campana de flujo laminar, hacer correctamente su limpieza con fenol al 5% y que el personal utilice aditamentos adecuados de trabajo como: guantes, gorro, cubrebocas y googles para asegurar no transferir ningún microorganismo al producto que se este manipulando.

En cuanto al sistema cerrado es importante la antisepsia apropiada del brazo del donador y por supuesto debe valorarse que no este cursando con alguna bacteremia asintomática que pueda causar la contaminación y por ende que diga la verdad en su examen médico en cuanto a su estado de salud. Los componentes sanguíneos más contaminados fueron los C.P.A., seguido de los C.P., y finalmente los C.P.C. Véase Tabla IV.

Para el sistema cerrado los microorganismos encontrados en su mayoría son patógenos oportunistas como las *Pseudomonas aeruginosa* y microorganismos de la biota nativa de la piel como *Micrococcus sp.*, y *Bacillus sp.* Véase Figura 6.

En general, como se puede observar en la Tabla I, el total de positivos fue de 1.22%; como se ve la frecuencia de contaminación si es diferente a otros países, comparado con Canadá es

alta, que es donde es más baja en comparación con U.S.A., y Bélgica que son países más desarrollados y la frecuencia es casi similar; por lo que nuestro el control de calidad utilizado en este estudio se puede considerar efectivo según la metodología descrita.

En la presente investigación se estudió más al sistema cerrado en el que se incluyen los C.P.A., y los C.P., que se contaminan más frecuentemente por sus condiciones de almacenamiento que prácticamente es un caldo de cultivo a 22 °C (temperatura ambiente y agitación continua), y por lo que facilita la multiplicación bacteriana. Mientras que es la óptima para la viabilidad y funciones de las plaquetas.

La técnica utilizada de antisepsia en el BCS CMN SXXI-IMSS fué cloruro de benzalconio, alcohol al 70% e isodine en torundas preparadas diariamente; y la aplicación entre cada uno de los antisépticos es de 30 segundos para la obtención de S.T., en cambio para los C.P.A., los antisépticos se depositaban en matraces de un litro, los cuales no se cambiaban frecuentemente; por lo cual se encontraron más de estos componentes contaminados con bacterias patógenas oportunistas como la *Pseudomona aeruginosa* y también puede deberse a una mala técnica de antisepsia, que cambió con la utilización de dispensadores para cada uno de los antisépticos y torundas esterilizadas.

Actualmente se utiliza en el BCS CMN SXXI-IMSS yodopolividona al 7.5% equivalente a 0.75% de yodo viable y yodopolividona al 10% equivalente al 1% de yodo viable, como técnica antiséptica.

Así mismo, el tipo de bolsas que se utilizan para la obtención de los C.P., y C.P.A., que permiten aumentar la permeabilidad a los gases se ha asociado con un aumento en la contaminación bacteriana de estas. Se ha descrito en la literatura la posibilidad de que la contaminación bacteriana de la sangre y cualquiera de sus componentes pueden producir reacciones sépticas post-transfusionales devastadoras, aunque afortunadamente son muy raras. Las bacterias pueden penetrar en las bolsas de S.T., o sus componentes durante la venopunción o preparación del componente, a pesar de las medidas de antisepsia que no disminuye al 100% la biota nativa.

Este método de detección por el equipo automatizado BacT/Alert[®] utilizada en la presente investigación en comparación con el cultivo clásico es lo más cercano a las características de una prueba ideal; ya que es más rápida porque en un tiempo de hasta 12 hs, mínimo pueden detectarse resultados positivos, además de que también es fácil de realizar y de interpretar, es más sensible que otras pruebas, como: la tinción de Gram, la tinción de naranja de acridina, la inspección visual, el swirling y las tiras indicadoras que aunque sean más rápidas, son menos sensibles y requieren que exista una concentración bastante grande de bacterias para que se pueda detectar si hay contaminación o no, y si bien hay otras pruebas como los ensayos de endotoxinas o técnicas de ADN/ARN y que necesita poca concentración de microorganismos, sólo se pueden aplicar para algunos de estos últimos y por otra parte son muy susceptibles de contaminarse con otros microorganismos o tienen escasa sensibilidad y/ó son demasiado complejas; lo que dificulta su aplicación práctica. Y aunque el método del BacT/Alert[®] requiere de varios medios de cultivo para poder detectar todas las especies bacterianas; es más rápida

y puede realizarse al tiempo en que el componente sanguíneo va a ser transfundido; está no sería la prueba ideal por no ser económica; pero hay otras pruebas en comparación con está más caras (por ejemplo: técnicas de ADN/ARN), y que además están más limitadas porque sólo detecta algunos microorganismos y son mucho más tardadas.

En la Tabla II se puede observar que se estudiaron en total 1641 productos sanguíneos de los cuales se obtuvieron 46 (2.80%) señales positivas en el BacT/Alert® y confirmados por cultivo solo fueron 20 (1.22%) y 26 (1.58%) corresponden a falsos positivos y de estos últimos 8 (0.49%) corresponden a errores del instrumento. Véase Figura 3 y Figura 9 y 10.

Las señales positivas fueron para los siguientes componentes:

- 1- B.C.
- 2- C.P.
- 3- C.P.A.
- 4- OPSO.
- 5- C.P.C.
- 6- P.
- 7- C.P.H.
- 8- C.P.A.D.

de los cuales sólo no se encontraron falsos positivos de C.P.C., P., y C.P.A.D.

Además, se puede observar que la diferencia entre los positivos detectados por el sistema automatizado BacT/Alert® y los positivos confirmados por cultivo tradicional no es mucha; es decir es un sistema bastante confiable y rápido. (Véase Figura 7 y 8).

En la Figura 4 el porcentaje mostrado de los errores del instrumento es muy bajo comparado con las señales positivas del BacT/Alert®.

Para el B.C., (Concentrado Leucoplaquetario), se encontraron 7 señales positivas las cuales fueron falsos positivos; este componente comúnmente se desecha pero se estudio debido a que tiene una gran cantidad de leucocitos y por su metabolismo (producción de CO₂), que es el componente que hace virar el indicador de las botellas de cultivo y que el equipo detecta como unidades de reflectancia; además de los leucocitos también contiene plaquetas, y se estudiaron para observar como se comportaban (comparación entre un falso positivo y un verdadero positivo). Además los falsos positivos también pueden deberse a un volumen mayor de sangre del recomendado por la casa comercial debido al CO₂ producido por las células sanguíneas, a cambios de temperatura del laboratorio, que el voltaje no sea el adecuado, ó que se deje abierta la puerta del equipo por más de 30 mín.

Los errores del instrumento podrían deberse para el B.C., a que con este producto se comenzó a probar el instrumento, además de que sirvió como una prueba basal para observar los falsos positivos debido a la producción de CO₂ del concentrado leucoplaquetario, como se menciona arriba; al igual que en las C.P.H., que son células de la médula ósea (células inmaduras) también productoras de CO₂; lo concerniente a los C.P.A., y las C.P.H., también se debió a

fallas eléctricas ya que el instrumento no estaba conectado a algún contacto de emergencia y aunque el incubador sigue trabajando, las señales detectadas no pasan al software del BacT/Alert®.

De hecho los C.P.A., fueron las que más falsos positivos se detectaron.

La contaminación bacteriana de C.E., P.F.C., y Crioprecipitados ocurre raramente, pero para los C.P., y los C.P.A., que están almacenadas a temperatura ambiente esto es más frecuente.

Es importante realizar el adecuado muestreo de los productos sanguíneos, pues se requiere una muestra del producto en su totalidad y no de la tubería segmentada adjunta; aunque una estrategia para obtener esta muestra sin abrir el sistema es dejar la continuidad directa de la tubería con el contenido de la bolsa y homogeneizar la tubería para obtener una muestra homogénea representativa.

Además para evitar posible contaminación por microorganismos exógenos se usaron técnicas de laboratorio diseñados para minimizar la contaminación inadvertida como por ejemplo: obtención de muestras asépticamente a través de material estéril, inoculación de cultivos dentro de una cabina de seguridad biológica, el uso de medios de cultivo controlados y la verificación de contaminantes por resiembra.

Aunque no se analizaron plasmas, estos son muy factibles de contaminarse por su descongelamiento en los baños para este fin, ya que estos últimos no se desinfectan adecuadamente, ni frecuentemente.

Cabe señalar que la esterilidad de la sangre total almacenada depende de 3 factores: técnica aséptica, un sistema estéril para la colección y almacenamiento e inmediata refrigeración continua, ya que la sangre guardada a temperatura ambiente por largos períodos es vista como una condición de riesgo de crecimiento de bacterias, donde las unidades de sangre pueden ser contaminadas inesperadamente. Estas medidas son altamente efectivas para la preservación de la sangre en un estado relativamente estéril.

Para las pruebas de control de calidad bacteriana, se utilizaron botellas de cultivo aeróbico por varias razones:

1. Los productos plaquetarios son almacenados bajo condiciones aeróbicas y por lo tanto proporciona un ambiente pobre para el crecimiento de organismos anaeróbicos estrictos;
2. Muchas de las bacterias anaeróbicas facultativas de significado clínico crece bajo condiciones aeróbicas.

En comparación con las pruebas que detectan a los virus estudiados en BCS CMN SXXI-IMSS (VIH, VHC, VHB), en los que estos pueden ser probados al tiempo de la donación, desafortunadamente para las bacterias no es así, es necesario dejar algunos días en almacenamiento el componente sanguíneo para poder encontrar bacterias que proliferan o que se encuentran en mayor concentración ya que al tiempo de la colección de la sangre puede haber una baja concentración de bacterias o no encontrarlas.

La sensibilización de todo el personal que realiza la venopunción es importante ya que son la base para que todo el proceso de obtención, separación, almacenamiento y destino final,

lleguen a buen término; pues deben entender que una buena técnica antiséptica con los antisépticos adecuados y el tiempo necesario entre la aplicación de uno y otro para evitar la entrada de bacterias y la adecuada flebotomía del brazo es vital, para evitar la formación de coágulos en los que pueden proliferar bacterias y esto puede ocasionar una sepsis al paciente y quizá hasta la muerte; por lo que no se debe menospreciar esta área tan importante.

Por último la sensibilidad (Véase Tabla V), de esta prueba en el sistema BacT/Alert® para detectar la contaminación en los componentes sanguíneos de este estudio es en general alta sobre todo para los siguientes componentes:

- 1- C.P.
- 2- OPSO
- 3- C.P.C.
- 4- C.P.H.
- 5- P.
- 6- C.P.A.D.

Es decir, posee una tasa baja de resultados falsos negativos. Para los componentes en que la sensibilidad es baja es:

- 1- B.C.
- 2- C.P.A.
- 3- C.P.D.

En el B.C., quizá debido al que este componente de desecho contiene la mayoría de leucocitos productores de CO₂ y por lo cual se obtienen falsos positivos, en el C.P.A., tal vez se deba a la falla con el voltaje eléctrico y para C.P.D., a que es un componente de sistema abierto.

La especificidad fue alta es decir, tuvo una tasa baja de falsos positivos para:

- 1- B.C.
- 2- C.P.
- 3- C.P.A.
- 4- OPSO.
- 5- C.P.C.
- 6- C.P.H.
- 7- P.
- 8- C.P.D.
- 9- C.P.A.D.

En el Valor Predictivo Positivo (VPP), para casi todos los componentes fue del 100%, excepto del B.C., y C.P.D., en el que fue del 50%, es decir esta proporción de componentes sanguíneos

con una prueba positiva realmente estuvieron contaminados por alguna bacteria de las encontradas en este estudio.

En el Valor Predictivo Negativo (VPN), casi todos estuvieron cercanos al 100%; y otros llegaron al 100% (Concentrados Plaquetarios Caducados); por lo tanto los componentes sanguíneos en los que no se encontró crecimiento bacteriano y que no dio señales positivas en el BacT/Alert® fueron realmente negativos; o sea no estuvieron contaminados. Véase Tabla VI.

13. CONCLUSIONES

Se determinó que la frecuencia en el BCS CMN SXXI-IMSS, es de 1.22% muy similar a lo informado por la literatura en otros países; por lo que significa que se tiene un control de calidad efectivo en cuanto a la antisepsia de la piel (obtención del producto), su procesamiento y por supuesto al almacenamiento.

El tipo de contaminación bacteriana se encontró que es tanto de la biota nativa de la piel (por ejemplo: *Micrococcus sp.*), ya que esta muchas veces puede ser inevitable y no puede disminuirse al 100% con las técnicas antisépticas; y como de patógenos oportunistas tales como la *Pseudomonas aeruginosa*.

Se logró establecer un método basado en el sistema BacT/Alert® para realizar el control de calidad microbiológico con mayor eficacia, rapidez y sensibilidad. Y poder asegurar la calidad de los componentes sanguíneos que se transfunden diariamente, y así poder disminuir el riesgo de transmisión de bacterias al receptor.

Y a pesar de que con este método también se busca tener unidades de sangre para transfundir libres de contaminación, es difícil por que aún con los mejores métodos de antisepsia no podemos eliminar completamente la biota nativa de la piel, pero lo que sí podríamos tener es un nivel de riesgo bajo de componentes sanguíneos contaminados.

Además en el área clínica, específicamente en el servicio de transfusiones de BCS CMN SXXI-IMSS al detectarse una reacción transfusional se envían muestras de sangre del paciente y el producto ó la unidad sanguínea al banco de sangre de primera instancia para descartar alguna incompatibilidad por grupo sanguíneo, pruebas cruzadas, anticuerpos irregulares u otra causa inmunohematológica, así como a el laboratorio de microbiología para la investigación de algún microorganismo tanto de la bolsa como una muestra de sangre del paciente. Esto es importante para poder localizar si hay otros productos sanguíneos del mismo donador, ponerlos en cuarentena, comprobar la posible contaminación y destruirlo(s). Si estos productos ya fueron administrados a otros pacientes, se debe notificar y tomar las medidas pertinentes.

Pues si la reacción es debida a contaminación bacteriana, la severidad clínica de estas reacciones depende de las especies bacterianas que se encuentren presentes en los productos sanguíneos. De hecho, los organismos Gram negativos causan reacciones más severas pues se multiplican rápidamente y además son bacterias productoras de endotoxinas. Sin embargo, si el número de cocos Gram positivos es suficiente, pueden causar la muerte al receptor.

El sistema de detección automatizada de microorganismos BacT/Alert® puede ser utilizada en un banco de sangre ó en un servicio de transfusiones de un hospital para un examen rápido sobre todo de los C.P.A., y los C.P., que son los que se contaminan con más frecuencia.

14. RECOMENDACIONES

La mayoría de los casos de la contaminación bacteriana de los componentes de sangre transfundidos no se reconoce como tal y no son detectadas. Por lo que es muy importante realizar un programa de vigilancia para identificar efectivamente el problema.

Es importante que si el paciente sufre una reacción transfusional sea tratado como si sufriera un choque séptico antes de que los resultados de las investigaciones de laboratorio estén disponibles. Aunque estas reacciones sépticas son no reconocidas frecuentemente, es indispensable que los médicos y enfermeras diferencien una reacción transfusional común a una reacción transfusional séptica asociada con productos sanguíneos.

Se deben dar antibióticos de amplio espectro e hidrocortisona endovenosa, junto con un adecuado reemplazo de líquidos y drogas vasopresoras.

Se proponen las siguientes medidas para reducir el riesgo de sepsis asociada a la transfusión:

- 1- Mejorar el examen del donador de sangre.
- 2- Mejorar la técnica de la antisepsia de la piel del brazo del donador.
- 3- Limitar el tiempo de almacenamiento de los diferentes componentes sanguíneos.
- 4- Examinar bacteriológicamente la posible contaminación con microorganismos en los componentes sanguíneos mediante: técnicas de cultivo (sistema de cultivo de sangre automatizado), inspección visual y tinción de Gram.
- 5- Desinfectar los baños de agua.
- 6- Vigilar, debido a que muchos de estos efectos adversos a menudo no son reconocidos, y por lo tanto, la magnitud precisa del problema no es informada.

Se espera que en un futuro, se puedan eliminar completamente los agentes infecciosos como virus y bacterias en todos los componentes sanguíneos. Se han propuesto algunas otras estrategias en diversos estudios, como:

- 1- Remover la primera alícuota de sangre (10-20 mL de la bolsa de colección).
- 2- La reducción leucocitaria (Extracción de las bacterias por filtros leucocitarios)
- 3- Descontaminación por: tratamiento de luz ultravioleta, psoralen S-59 y vitamina B2 (riboflavina).
- 4- Uso de antibióticos u otros desinfectantes, pero no deben ser tóxicos ni para los elementos sanguíneos, ni para los receptores de los productos sanguíneos.

En cuanto a los servicios de transfusión, a las unidades de transplante de médula ósea, u hospitales donde se lleva a cabo el proceso de transfusión alogénica es importante y necesaria la investigación de las reacciones transfusionales para el adecuado diagnóstico, la elección de una terapia apropiada, el manejo de la transfusión y la prevención de futuras reacciones y ojala se pudieran incluir las correlaciones entre los datos clínicos y los resultados de laboratorio.

De hecho, estos servicios, así como el banco de sangre que proporcionó el componente sanguíneo; deben contar con protocolos para la investigación de reacciones transfusionales ya que es de vital importancia para interpretar y evaluar el estado clínico del paciente y no necesariamente puede deberse a una sepsis.

Por último, se sugiere que: al donador hay que pedirle que si después de haber realizado su donación dentro de una semana cursa con diarrea, vómito, fiebre u otro signo o síntoma que indique enfermedad lo notifique al banco de sangre, pues tal vez sea portador de algún microorganismo y curse con alguna infección asintomática. Y así se puedan rescatar las fracciones sanguíneas, para estudiarlas y después se eliminen.

ANEXO 1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

TSI (AGAR HIERRO-TRIPLE AZÚCAR)

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Recoger el centro de la colonia con una asa bacteriológica.
- c) Tubo en pico de flauta: 1) picadura en la capa profunda; 2) inoculación en “cola de pescado”.
- d) Incubar a 35 °C, durante 18 a 24 hs, ni antes ni después.

Interpretación

- A) Utilización del hidrato de carbono
 1. Fermentación de la glucosa solamente.
 - a) En pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.
 - b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.
 - I. Si también se produce gas H₂S el precipitado negro puede ocultar la acidez.
 - II. Existe acidez en la capa profunda, que se registra como tal.
 2. Fermentación, tanto de la glucosa como de la lactosa.
 - a) Pico de flauta. Reacción ácida. Color amarillo.
 - b) Capa profunda. Reacción ácida. Color amarillo.
 3. No fermentación de la glucosa ni de la lactosa (no entéricos).
 - a) Pico de flauta. Reacción alcalina. Color rojo.
 - b) Capa profunda.
 - I. Organismo aeróbico. No se observa crecimiento. No hay cambio de color. El color es el mismo del tubo no inoculado. Color anaranjado rojizo. Si no hay seguridad, comparar con el tubo no inoculado.
 - II. Organismo facultativo. Reacción alcalina. Color rojo.
 4. No fermenta ni la glucosa ni la lactosa, bastante común.
 - a) Pico de flauta.
 - I. Crecimiento solamente.
 - II. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado (color anaranjado rojizo).

- b) Capa profunda.
 - I. Crecimiento solamente.
 - II. No hay cambio de color; el mismo del tubo no inoculado (color anaranjado rojizo).
- B) Producción de gas
 - 1. Aerogénico.
 - a) Producción de gases: CO_2 y H_2 .
Se manifiesta por lo siguiente:
 - I. Una sola burbuja de gas.
 - II. Burbujas en el medio.
 - III. Desdoblamiento del medio.
 - IV. Desplazamiento completo del medio del fondo del tubo, dejando un área clara.
 - V. Ligera muesca del medio en el costado del tubo.
 - 2. Anaerogénico: no hay producción de gases.
- C) Producción de ácido sulfhídrico (H_2S); la presencia de un precipitado negro (sulfuro ferroso) se manifiesta por:
 - 1. Un color negro distribuido por toda la capa profunda y que enmascara la acidez; puede haber una ligera evidencia en el pico de flauta.
 - 2. Un anillo negro cerca de la parte superior de la capa profunda.
 - 3. Un precipitado negro distribuido por la capa profunda, pero no oculta totalmente la acidez.

Cuando se interpreta un resultado en TSI puede observarse la combinación de cualquiera de las reacciones antes mencionadas. Buscar siempre las tres características: 1) fermentación de los hidratos de carbono; 2) producción de gases (CO_2 y H_2), y 3) producción de H_2S . Registrar todas las observaciones.

CITRATO DE SIMMONS

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo liviano.
- c) Únicamente en cola de pescado sobre un medio en pico de flauta.
- d) Incubar a 35 °C, durante 24 a 48 hs. A veces es necesaria una incubación más prolongada (hasta cuatro días).

Interpretación

1. Prueba positiva: crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.
2. Prueba negativa: no se observa crecimiento ni cambio de color (verde).

LIA (AGAR HIERRO-LISINA)

Método de incubación

- a) Cultivo puro.
- b) Recoger el centro de la colonia con una asa bacteriológica.
- c) Tubo en pico de flauta: 1) picadura en la capa profunda; 2) inoculación en “cola de pescado”.
- d) Incubar a 35 °C, durante 24 hs, a cuatro días.

Interpretación

1. Prueba positiva: púrpura turbio a un púrpura amarillento apagado (producido por la cadaverina).
2. Prueba negativa: color amarillo claro y brillante (solamente fermentado por la glucosa).

MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA)

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo liviano.
- c) Por picadura, es importante que el asa bacteriológica sea retirada a lo largo del mismo camino que se usó para atravesar inicialmente el medio.
- d) Incubar a 35 °C durante 18 a 24 hs.

Interpretación

Color amarillo (descarboxilación de la ornitina a la putrescina).

1. Indol (agregar dos o tres gotas de reactivo de Kovac).
Anillo color rojo púrpura: Positiva.
Anillo color amarillo: Negativa.
2. Movilidad.
Crecimiento sólo en la punción: Negativa.
Crecimiento en todo el medio: Positiva.

SIM (ÁCIDO SULFHÍDRICO-INDOL-MOTILIDAD)

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo liviano.
- c) Por picadura, es importante que el asa bacteriológica sea retirada a lo largo del mismo camino que se usó para atravesar inicialmente el medio.
- d) Incubar a 35 °C durante 18 a 24 hs.

Interpretación

1. Ácido sulfhídrico.

Ennegrecimiento del medio: Positivo.

No hay cambio del medio: Negativo.

2. Indol (agregar dos o tres gotas de reactivo de Kovac).

Anillo color rojo púrpura: Positiva.

Anillo color amarillo: Negativa.

3. Movilidad.

Crecimiento sólo en la punción: Negativa.

Crecimiento en todo el medio: Positiva.

CALDO UREA

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo denso.
- c) Agitar suavemente el tubo para lograr la suspensión de bacterias.
- d) Incubar a 35 °C, durante 18 a 24 hs.

Interpretación

1. Reacción positiva. Color rojo rosado intenso en todo el caldo.
2. Reacción negativa. No se produce cambio de color (amarillo anaranjado).

PRUEBA DE LA CATALASA

Método

- A) Pruebas de la catalasa de rutina, a la temperatura del ambiente (25 °C).
 - 1. Método del portaobjetos, procedimiento recomendado.
 - a) Con una aguja de inoculación recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 hs., y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio.
 - b) La prueba no podrá aplicarse si el agar sangre es introducido en el H₂O₂.
 - c) Agregar una gota de H₂O₂ al 30% sobre el organismo del portaobjetos. Usar un gotero o una pipeta de Pasteur.
 - I. No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos.
 - II. No mezclar con la aguja o el asa de inoculación. No es necesaria la mezcla del cultivo y el H₂O₂.
 - d) Observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) y registrar el resultado.
 - e) Desechar el portaobjetos poniéndolo en un desinfectante.

Interpretación

- A) Prueba positiva: formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de O₂).
- B) Prueba negativa: no hay formación de burbujas (no se forma O₂).

PRUEBA DE LA COAGULASA

Método

Prueba en tubo de ensayo, coagulasa ligada y libre.

- 1. Tubo de ensayo de vidrio (13 X 100) esterilizado.
 - a) Agregar 0.5 ml de plasma humano, no diluido y previamente controlado.
 - b) Recoger con el asa una buena cantidad de una colonia pura de una placa de agar.
 - I. Hacer girar el tubo suavemente para lograr la suspensión del organismo. No agitar.
 - II. Incubación.
 - a) En baño de agua a 37 °C.
 - b) 4 hs., observar cada 30 min si se produce la coagulación.

Interpretación

1. Prueba positiva.
 - a) Se forma coágulo o filamentos de fibrina definidos.
 - I. Completa; el coágulo abarca todo el tubo.
 - II. Parcial; el coágulo no se extiende por toda la columna de líquido. Cualquier grado de coagulación se considera positivo.
2. Prueba negativa.
 - a) No hay formación de coágulo, la suspensión se mantiene homogénea (igual que en el tubo no inoculado).

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo espeso. Pasar el asa de inoculación sobre el crecimiento de un cultivo puro.
- c) Asépticamente, introducir la aguja o el asa en cada uno de los tubos de hidrato de carbono.
- d) Agitar suavemente cada tubo. No dejar que el líquido salpique la tapa del tubo.
- e) Incubar a 35 °C, durante 18 a 24 hs.
 1. Puede ser necesaria una incubación prolongada.
 2. Puede ser necesaria una incubación de hasta 30 días para considerar negativo un resultado.

Interpretación

1. Positivo.
 - a) Ácido.
 - b) Color amarillo.
 - c) Producción de gas, variable.
 - I. Positivo para gas (G).
 - A) Aerogénico: se encuentra $\text{CO}_2 + \text{H}_2$.
 - B) Se observan burbujas de gas en el tubo de Durham, o el medio se halla completamente desplazado por el gas que deja una parte sin colorear en el tubo incluido.
 - C) Una sola burbuja en el tubo de Durham basta para registrar producción de gas.
 - D) Registrar producción de ácido y gas (AG).

2. Negativa para gas.
 - a) Anaerogénica.
 - b) No se observan burbujas de gas y el medio del tubo de Durham se mantiene amarillo.
 - c) Registrar producción de ácido solamente (A).

3. Retardada.
 - a) Color anaranjado. Si no se tiene seguridad, comparar con el tubo no inoculado.
 - b) Volver a incubar.

4. Negativa.
 - a) Alcalina.
 - b) Color rosa-rojizo.

PRUEBA DE LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA

Método de inoculación

- a) Mantener en el refrigerador los tubos de gelatina hasta el momento de su inoculación. El medio debe estar solidificado.
 1. Cultivo puro.
 2. Inóculo espeso.
 3. Hacer una punción en el medio hasta una profundidad de 1½ a 2½ cm.

- b) Preparar un tubo de control para hacer la prueba junto con los de la bacteria en estudio. Rotular control.
- c) Incubar simultáneamente los tubos de prueba y de control; a 22-25 °C o a 35 °C por 24 hs, a 14 días.
- d)

Interpretación

Precauciones: enfriar el medio si se ha incubado a 37 °C antes de interpretar los resultados.

1. Positivo.
 - a) Organismo en estudio: medio licuado.
 - b) Tubo de control: el medio se mantiene sólido.
2. Negativo.
 - a) Organismo en estudio: El medio se mantiene sólido. Volver a incubar durante un período adicional.
 - b) Tubo control: el medio se mantiene sólido.

PRUEBA DEL MALONATO

Método de Inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo poco denso.
- c) Incubar a 35 °C de 24 a 48 hs; observar si se produce crecimiento al término de cada período.

Interpretación

- A) Prueba positiva: color azul claro a azul de Prusia intenso en todo el medio.
- B) Prueba negativa: no se observa cambio de color (verde) o amarillo (únicamente fermentación de la glucosa).

PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL NITRATO

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Medio de caldo: inóculo denso.
- c) Medio de agar en pico de flauta: cola de pescado en el pico de flauta y punción en la capa profunda.
- d) Deben hacerse simultáneamente dos controles.
 - I. Tubo de control 1: inoculado con un organismo nitrato positivo conocido.
 - II. Tubo de control 2: no inoculado, pero tratado en las mismas condiciones que el inoculado. Controlar para determinar si hay nitrito en el medio.
- e) Incubar a 35 °C por 12 a 24 hs.
- f) Agregar reactivos de nitrato antes de hacer la interpretación.
 1. Agregar directamente a un cultivo de nitrato incubado:
 - *Reactivo A: 1 mL (α -naftilamina, 0.5%).
 - **Reactivo B: 1 mL (ácido sulfanílico, 0.8%).

Interpretación

1. Prueba positiva.
 - a) Color rosado a rojo intenso.
 - b) Nitrato (NO_3) reducido a nitrito (NO_2) por el organismo.
 - c) Prueba completa.

2. Prueba negativa.
 - a) No se ha desarrollado color.

PRUEBA DE LA OXIDASA

- A) Tiras para la prueba de la citocromoxidasa.
 - 1) Resultados dentro de los 30 seg.
 - 2) Principio: dimetil-p-fenilendiamina + α -naftol \rightarrow azul de indofenol (color azul intenso).
 - 3) Método: seguir las indicaciones del fabricante.
 - 4) Correlación con las pruebas standard: 100%.

PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN (OF)

Método de inoculación

(Prueba standard en dos tubos)

1. Cultivo puro.
2. Para cada hidrato de carbono que se use, inocular un par de tubos OF para cada organismo en estudio. Rotular uno abierto y el otro cerrado (sellado).
3. Inóculo poco denso.
 - a) Picar con una aguja de inoculación ambos tubos aproximadamente hasta 0.6 mm del fondo.
 - b) Cubrir todos los tubos cerrados (o sellados), con 1 a 2 mL de vaselina o parafina fundida estéril, para excluir el oxígeno.
4. Incubar a 35 °C por 48 hs, o más; puede necesitar de 3 a 4 días o hasta 14 días de incubación prolongada.

Interpretación

- A) Además de la utilización de los hidratos de carbono, puede detectarse con un medio OF la producción de gases y la motilidad. Registrar la producción de gas y/o ácido y la reacción de motilidad de cada tubo, utilizando las siguientes abreviaturas:
 1. Reacciones con hidratos de carbono.
 - a) Ácido: A.
 - b) Ácido y gas: AG.
 - c) Sin cambio o reacción alcalina: Sc o (-) .
 2. Determinaciones OF.
 - a) Fermentativa: F.
 - b) Oxidativa: O.
 - c) Ni oxidativa ni fermentativa: (-).

3. Motilidad.

- a) Con motilidad: (+) (crecimiento que se aleja de la línea de punción).
- b) Sin motilidad: (-) (crecimiento limitado a la línea de punción).

B) Formas de utilización OF de los hidratos de carbono

Tipo de metabolismo	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo cubierto (sellado)
1. Oxidación (O)	Abierto	Amarillo (A)	Verde (-)
2. Fermentación (F) (anaerogénica)	Cubierto	Amarillo (A)	Amarillo (A)
3. Fermentación (F) (aerogénica)	Cubierto	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
4. Ni fermentación ni oxidación (-)	Ninguno	Azul o verde (-)	Verde (-)
5. Fermentación y oxidación (O+F)	Ambos	Amarillo (A o AG)	Amarillo (A o AG)

PRUEBA DE LA FENILALANINA-DESAMINASA

Método de inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo denso.
- c) Incubar a 35 °C, 4 o 18 a 24 hs.
- d) Agregar 4 a 5 gotas de FeCl₃ directamente a un tubo inoculado de 18 a 24 hs, hacer que el reactivo se deslice suavemente sobre el pico de flauta. Si el tubo es inoculado densamente, serán suficientes 4 h de incubación.
- e) Hacer rotar suavemente el tubo para que el crecimiento se separe.
- f) En el término de 1 a 5 min se produce una reacción positiva de color verde en el pico de flauta, y en el líquido de sinéresis.

Interpretación

- A) Prueba positiva: Formación de un color rojo claro a intenso en el pico de flauta y en el líquido de sinéresis.
- B) Prueba negativa: no se produce cambio de color; se mantiene amarillo por el color del reactivo cloruro férrico.

PRUEBA DEL ROJO DE METILO

Método de Inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo poco espeso.
- c) Incubar a 35 °C por 48 hs.
- d) Asépticamente, con pipeta, retirar una alícuota de 2.5 mL para la determinación del rojo de metilo.
- e) Agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo a la alícuota.
- f) Interpretar el resultado de color inmediatamente.

Interpretación

- A) Prueba RM positiva: el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH: 4,4) en la superficie del medio.
- B) Prueba RM negativa: color amarillo (pH: 6) en la superficie del medio.
- C) Reacción retardada: color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir la prueba.

REACCIÓN DE VOGES-PROSKAUER

Método de Inoculación

- a) Cultivo puro.
- b) Inóculo poco denso.
- c) Incubar a 35 °C de 24 a 48 hs; puede necesitar una incubación más prolongada, hasta de 10 días.
- d) Asépticamente (con una pipeta) retirar una alícuota de 2.5 mL para la reacción de Voges-Proskauer.
- e) Agregar directamente los reactivos VP a la alícuota, en el orden siguiente:
 1. Primero: 0.6 ml de una solución de α -naftol al 5 %.
 2. Segundo: 0.2 ml de una solución de KOH al 40% (o NaOH al 40%).
 3. Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina (acetilmetilcarbinol) y obtener una reacción de color.
- f) Deja descansar el tubo por lo menos durante 10 a 15 min antes de intentar la interpretación del color.

Interpretación

- A) Reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina).
- B) Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa (debido a la acción de los reactivos al mezclarse).

MICROTÉCNICAS: SISTEMAS MULTIPRUEBAS O EQUIPOS

- A) Sistema microtubos API.
 - 1. Microtécnica para la identificación de Enterobacteriaceae, después de 24 hs., de incubación.
 - a) Tira de plástico que contiene 10 (API 10 screen) o 20 (API 20E) compartimientos en miniatura.
 - b) Sustratos deshidratados.
 - c) Un inóculo simple, en suspensión acuosa.
 - 2. Método: seguir las indicaciones del fabricante

GLOSARIO

Antisepsia. Conjunto de métodos destinados a combatir los gérmenes patógenos causantes de las infecciones.

Antiséptico. Sustancia que destruye los microorganismos o impide su crecimiento.

Banco de Sangre. Unidad hospitalaria que se ocupa de la obtención, separación de los componentes y almacenamiento en condiciones óptimas de la sangre humana para su aplicación en terapéutica transfusional conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM 003-SSA2-1993) y al criterio de los profesionales que integran la medicina transfusional.

Células progenitoras hematopoyéticas (CHP). Las precursoras de las varias líneas celulares de la sangre. Inicialmente se les denominó células tronco, células totipotenciales, etc. Se separan de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre placentaria.

Concentrados plaquetarios. Unidad de estas células separada de la sangre recolectada en una sangría o mediante hemaféresis.

Concentrado eritrocitario. Término empleado para designar las unidades de sangre a las que se les ha retirado el plasma.

Crioprecipitado. Componente de la sangre obtenida mediante precipitación en frío del plasma separado de la sangre total.

Criopreservación. Procedimiento para el almacenamiento de los componentes de la sangre a temperatura entre -30 y -80 °C o menor, por lapsos de un año o de mayor duración.

Donador de sangre. Persona que regala su sangre para fines terapéuticos transfusionales.

Hemodilución. Fenómeno fisiológico o patológico en el que, sin haber disminución de la masa eritrocítica, hay un aumento de volumen plasmático, lo que produce valores subnormales de concentración de hemoglobina en sangre. Se le denomina también anemia fisiológica o pseudoanemia.

Hemodilución preoperatoria. Procedimiento de autodonación en el que se extrae una parte del volumen sanguíneo circulante, que es reemplazado enseguida por una solución macromolecular que permite conservar el volumen diastólico.

Opsonización. Se produce cuando sobre la membrana de una célula se fijan anticuerpos específicos, complemento, fibronectina o proteínas de fase aguda; favorece la fagocitosis por los macrófagos y los polimorfonucleares.

Panel de células de fenotipo conocido. Conjunto de células (eritrocitos) de grupo O a las que se les ha determinado el fenotipo de sistemas de grupos distintos al ABO y que son representativas de algún antígeno específico. Se emplean para la identificación de anticuerpos irregulares anti-eritrocitos.

Aféresis. Obtención de las plaquetas mediante centrifugación continua o discontinua de la sangre obtenida de un donador.

Transfusión. Acto terapéutico durante el cual se aplica sangre mediante cenoclis como medida terapéutica.

REFERENCIAS.

- 1- Norma Mexicana IMNC ISO9000-2000. COPANT/ISO 9000-2000. NMX-CC-9000-IMNC-2000. Sistemas de Gestión de Calidad. Fundamentos y vocabulario. 2001; 14/42.
- 2- Goldman M, Blajchman MA. Blood Product-Associated Bacterial Sepsis. *Transfusion Med Rev* 1991; 5: 73-83.
- 3- Barbara JAJ, Contreras M. Complicaciones infecciosas de la transfusión: bacterias y parásitos. En: Contreras M. ABC de la transfusión. 2ª. edición. Gran Bretaña. Edit. Mediterráneo; 1994. p. 45-47.
- 4- Gudino DM. Contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos. 2º. Congreso Internacional de Medicina Transfusional. 15-19 JUNIO 1999. ACAPULCO-GUERRERO-MÉXICO.
- 5- McDonald PC, Lowe P, Roy A, Robbins S, Hartley S, Harrison JF, Slopecki A, et al. Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sanguinis* 2001; 80: 135-141.
- 6- de Korte D, Marcelis JH, Soeterboek AM. Determination of the degree of bacterial contamination of whole-blood collections using an automated microbe detection system. *Transfusion* 2001; 41: 815-818.
- 7- Holden F, Foley M, Devin G, Kinsella A, Murphy GW. Coagulase-negative staphylococcal contamination of whole blood and its components: the effects of WBC reduction. *Transfusion* 2000; 40: 1508-1513.
- 8- Schaffner W. Skin antisepsis at the donor site: is there room for improvement? *Transfusion* 1997; 37: 249-250.
- 9- Goldman M, Roy G, Fréchette N, Décary F, Massicotte L, Delage G. Evaluation of donor skin disinfection methods. *Transfusion* 1997; 37: 309-312.
- 10- Secretaria de Salud. Norma oficial mexicana. NOM-003-SSA2-1993. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. 1993; 61-92.
- 11- Mertens G, Muylle L, Goossens M. Possible implication of sterile connecting device in contamination of pooled platelet concentrates. *Transfus Sci* 1997; 387-392.
- 12- Blajchman HA, Ali AM, Richardson HL. Bacterial contamination of cellular blood components. *Vox Sang* 1994; 67(53): 25-33.
- 13- Goldman M, Sher G, Blajchman M. Bacterial contamination of cellular blood products: the Canadian perspective. *Transfus Sci* 2000; 23: 17-19.
- 14- Yomtovian R, Lazarus HM, Goodnough LT, Hirschler NV, Morrissey AM, Jacobs MR. A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 1993; 33: 902-909.
- 15- Ness PM. Bacterial transmission by transfusion. En: Rossi EC. Simon TL. Moss GS. Gould SA. Principles of transfusion medicine. 2ª. edición USA.: Edit. Williams and Wilkins; 1996. p. 739-742.
- 16- Liu H, Yuen K, Cheng TS, Lee K, Chua EK, Ho P, Lin CH. Reduction of platelet transfusion-associated sepsis by short-term bacterial culture. *Vox Sang* 1999; 77: 1-5.

- 17- Bruneau C, Perez P, Chassaigne M, Allouch P, Audurier A, Gulian C, Janus G, et al. Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion* 2001; 41: 74-81.
- 18- Wagner JS, Friedman IL, Dodd YR. Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; 7(3):290-302.
- 19- Fang ChT, Chambers LA, Kennedy J, Strupp A, Fucci MH, Janas JA, Tang Y, et al. Detection of bacterial contamination in apheresis platelet products: American Red Cross experience, 2004. *Transfusion* 2005; 45: 1845-1852.
- 20- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10a. edición. Gran Bretaña. Edit. Blackwell Science; 1997. p. 500, 549-552.
- 21- Högman CF. Adverse effects: Bacterial contamination (including shelf life). A brief review of bacterial contamination of blood components. *Vox Sang* 1996; 70(S3): 78-82.
- 22- Brecher ME, Means N, Jere SCh, Heath D, Rothenberg S, Stutzman CL. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis with 15 contaminating organisms. *Transfusion* 2001; 41: 477-482.
- 23- Brecher EM, Heath GD, Hay NS, Rothenberg JS, Stutzman Ch. Evaluation of a new generation of culture bottle using an automated bacterial culture system for detecting nine common contaminating organisms found in platelet components. *Transfusion* 2002; 42: 774-779.
- 24- Buchholz DH, Young VM, Fredman JR, Reilly JA, Mardiney MR. Bacterial proliferation in platelet products stored at room temperature. *N Engl J Med* 1971; 285(8): 429-433.
- 25- Ness P, Braine H, King K, Barrasso C, Kickler T, Fuller A, Blades N. Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion* 2001; 41: 857-861.
- 26- Soeterboek AM, Welle FHW, Marcelis JH, van der Loop CMF. Sterility testing of blood products in 1994/1995 by three cooperating blood Banks in the Netherland. *Vox Sang* 1997; 72: 61-62.
- 27- Leiby DA, Kerr KL, Campos JM, Dodd RY. A retrospective analysis of microbial contaminants in outdated random-donor platelets from multiple sites. *Transfusion* 1997; 37: 259-263.
- 28- Cid J, Lozano M, Nomdedeu B, Mazzara R, Vila J, Rives S, Ordinas A. Sepsis estafilocócica asociada a transfusión de plaquetas: Aportación de un nuevo caso y revisión de la literatura. *Sangre* 1997; 42(5): 407-409.
- 29- Wallas ChH. Transfusion of blood components contaminated with bacteria. En: Smith DM, Dodd RY. *Transfusion-transmitted infections*. USA. Edit. ASCP Press (American Society of Clinical Pathologists) Chicago; 1991: 195-206.
- 30- Brecher ME, Holland PV, Pineda AA, Tegtmeier GE, Yomtovian R. Growth of bacteria in inoculated platelets: implications for bacteria detection and the extension of platelet storage. *Transfusion* 2000; 40: 1308-1312.
- 31- Högman FC. Aspects of platelet storage. *Transfus Sci* 1994; 15(4): 351-355.

- 32- Krishnan LAG, Brecher ME. Transfusion-transmitted bacterial infection. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1995; 9(1): 167-185.
- 33- Mitchell KMT, Brecher ME. Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. *Transfus Med Rev* 1999; 13(2): 132-144.
- 34- Barrett BB, Andersen JW, Anderson KC. Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components. *Transfusion* 1993; 33: 228-233.
- 35- Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of an automated microbiologic blood culture device for detection of bacteria in platelet components. *Transfusion* 1998; 38: 674-679.
- 36- Jacobs MR, Palavecino E, Yomtovian R. Don't bug me: the problema of bacterial contamination of blood components-challenges and solutions. *Transfusion* 2001; 41: 1331-1334.
- 37- Wagner JS, Robinette D. Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet-concentrates. *Transfusion* 1996; 36: 989-993.
- 38- Blajchman AM. Bacterial contamination and proliferation during the storage of cellular blood products. *Vox Sanguinis* 1998; 74(Suppl.2): 155-159.
- 39- American Association of Blood Banks. Technical manual. 12a. edición. USA. AABB; 1996. p. 522-523, 583-585.
- 40- Garcés AME, Calderón GED, Bravo LA, Sánchez GS. Reacciones adversas a la transfusión sanguínea. *Revista de Hematología* 2001; 2(1): 12-19.
- 41- van Doorne H, van der Tuuk Adriani WPA, van de Ven LI, Bosch EH, de Natris T, Smit Sibinga CT. Saponin, an inhibitory agent of carbon dioxide production by white cells: its use in the microbiologic examination of blood components in an automated bacterial culture system. *Transfusion* 1998; 38: 1090-1095.
- 42- Webb IJ, Coral FS, Andersen JW, Elias AD, Finberg RW, Nadler LM, Ritz J, et al. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion* 1996; 36: 782-788.
- 43- Schwella N, Zimmermann R, Heuft HG, Blasczyk R, Beyer J, Rick O, Kreißig C, et al. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. *Vox Sang* 1994; 67: 32-35.
- 44- Padley D, Koontz F, Trigg ME, Gingrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion* 1996; 36: 53-56.
- 45- Mc Donald CP, Rogers A, Cox M, Smith R, Roy A, Robbins S, Hartley S, et al. Evaluation of the 3D BacT/ALERT automated culture system for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. *Transfusion Medicine* 2002; 12: 303-309.
- 46- Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, DiGuseppi JL, Willert M, Mirrett S, Reller LB. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol* 1990; 2: 1608-1612.

47- MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Edit: Médica Panamericana; 1991. p. 32-35, 41-42, 46-47, 54-55, 65-67, 85-88, 97-101, 106-109, 116-117, 128-129, 135-137, 139-141, 143-146, 156-158, 163-165, 169-171, 193-196.