



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CRITICA**

HOSPITAL GENERAL "DR. GEA GONZALEZ"

TITULO

“Correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs. cultivos cuantitativos del lavado broncoalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVIM)”

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE SUBESPECIALIDAD
EN MEDICINA CRITICA**

PRESENTA

**Dra. Esther Azucena Fernández Hernández.
Médico Residente de segundo año de Medicina Critica**

ASESOR

**Dr. Raymundo Rodríguez Badillo.
Adscrito a la Unidad de Cuidados Intensivos**

MEXICO , D.F. JULIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

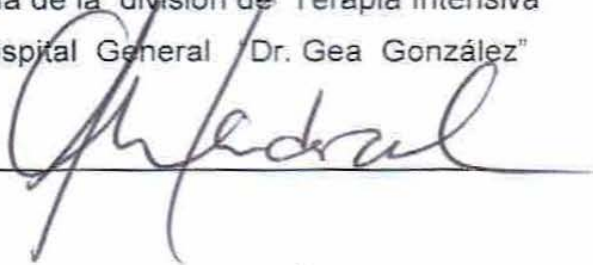
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

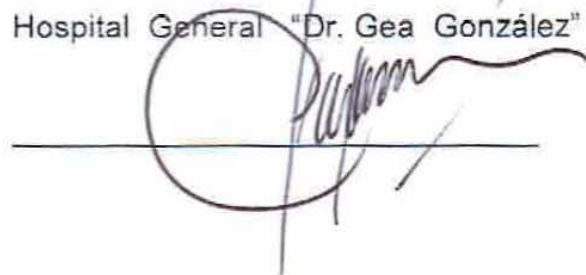
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Este trabajo de tesis con número 26142015, presentado por la alumna Esther Azucena Fernández Hernández se presenta en forma de visto bueno por el Tutor principal de Tesis Dr. Raymundo Rodríguez Badillo , y la división de Terapia Intensiva a cargo de la Dra. Jordana Lemus Sandoval con fecha del 01 julio 2015 para su impresión final.

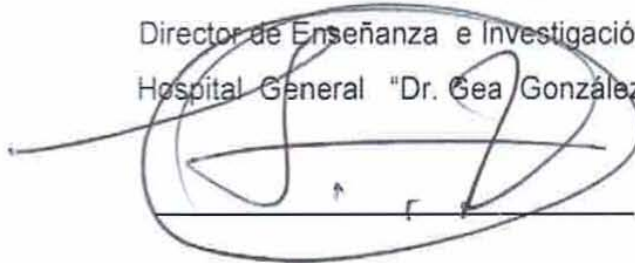
Dra. Jordana Lemus Sandoval
Jefa de la división de Terapia Intensiva
Hospital General "Dr. Gea González"



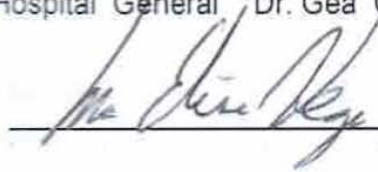
Dr. Raymundo Rodríguez Badillo
Medico Adscrito a Terapia Intensiva
Hospital General "Dr. Gea González"



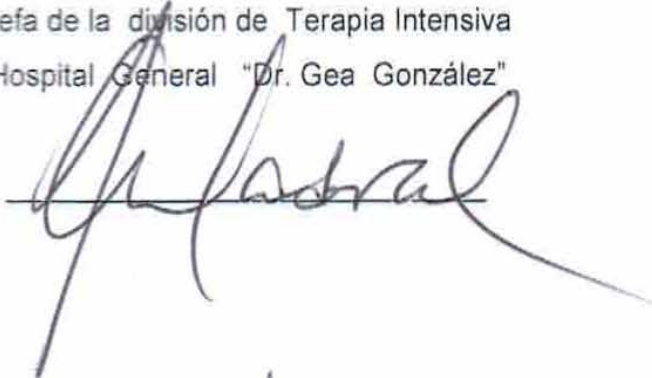
Octavio Sierra Martinez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General "Dr. Gea González"



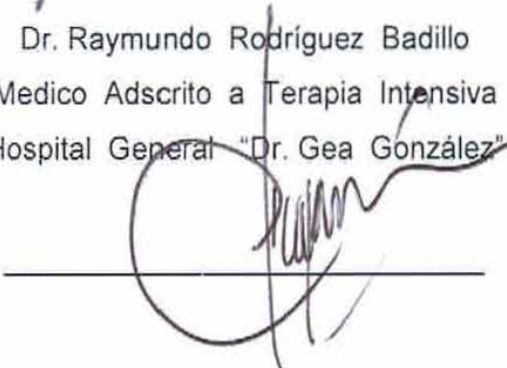
Dra. Ma. Elisa Vega Memije
Subdirectora de Investigación
Hospital General "Dr. Gea González"



Dra. Jordana Lemus Sandoval
Jefa de la división de Terapia Intensiva
Hospital General "Dr. Gea González"



Dr. Raymundo Rodríguez Badillo
Medico Adscrito a Terapia Intensiva
Hospital General "Dr. Gea González"



INDICE

ANTECEDENTES.....	1
MARCO DE REFERENCIA.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
JUSTIFICACION.....	9
OBJETIVO.....	10
HIPOTESIS.....	11
DISEÑO.....	12
MATERIALES Y METODOS.....	12
DEFINICION DE VARIABLES.....	13
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.....	19
CALENDARIO.....	20
RECURSOS.....	21
VALIDACION DE DATOS Y PRESENTACION DE RESULTADOS.....	23
CONCLUSION.....	27
CONCENTIMIENTO INFORMADO.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	30

ANTECEDENTES.

En el 2012, la Neumonía ocupó la octava causa de muerte en México, con 1534 defunciones ¹.

La Neumonía Asociada a la Ventilación Mecánica (NAVVM), es definida como aquella infección en el parénquima pulmonar que ocurre en pacientes bajo intubación endotraqueal y que reciben ventilación mecánica por más de 48hrs ².

La NAVVM tiene una elevada mortalidad, morbilidad y costos médicos intrahospitalarios³. Es una común y fatal complicación en la Terapia Intensiva. La mortalidad varía desde 25 % al 70% y está relacionada con el uso inapropiado de antimicrobianos⁴.

Su incidencia en general está reportada entre el 7% y 30%. El riesgo para el desarrollo de la NAVVM es alta en los primeros días después de la admisión hospitalaria, hasta los ocho días posteriores de la intubación. ⁵

En los pacientes con ventilación mecánica, el sistema inmune está alterado por las enfermedades críticas, comorbilidades y la desnutrición. Una de las más importantes condiciones que favorecen la entrada de bacterias al tracto respiratorio inferior es el tubo endotraqueal. El tubo endotraqueal es el primer mecanismo de vía de entrada para romper las barreras anatómicas formadas por la glotis y la laringe. Así como la supresión del reflejo de tos como resultado de la sedación. La orofaringe, los senos paranasales, y el estómago han sido propuestos como un potencial reservorio de material infectado, así como la formación del biofilm en el inerte tubo endotraqueal ⁶.

La patogénesis de la NAVVM primariamente es por la introducción de patógenos microbianos por la microaspiración en el paso del tubo endotraqueal al tracto respiratorio bajo⁷. Subsecuentemente la colonización depende de las barreras mecánicas (reflejo de la tos, limpieza mucociliar, barreras epiteliales), respuesta humoral y celular del huésped. Y en los pacientes críticamente enfermos se ha observado alteración en la actividad neutrofílica fagocítica, debido a las acciones de anafilotoxinas y en el complemento C5a, así como la disfunción de las células T, monocitos ^{8,9}.

Otras potenciales rutas de diseminación menos comunes son la hematogena o de un equipo respiratorio contaminado como el broncoscopio, nebulizadores, agua, aire¹⁰.

Así como la gravedad de la enfermedad de base, una cirugía previa, la exposición a antibióticos, han sido propuestos como factores de riesgo para su desarrollo¹¹.

El diagnóstico de neumonía asociada a la ventilación mecánica está basado en tres criterios de acuerdo al CDC (*Centers of Disease Control* de los EE.UU.), es decir signos y síntomas tempranos: respuesta inflamatoria sistémica de infección (por lo menos uno; temperatura $>38.3^{\circ}\text{C}$, leucocitosis $>12,000$ o $<4,000$ mm^3), alteraciones del estado de alerta sin otra causa reconocida), al menos dos de los siguientes signos: a) secreciones traqueales purulentas, b) incremento de la frecuencia respiratoria, c) aparición de estertores bronquiales o d) disminución de la relación $\text{PaO}_2/\text{fracción inspirada de oxígeno}$ < 240 mmhg o incremento de la demanda de oxígeno así como nuevos hallazgos radiológicos o empeoramiento de infiltrados, condensación o cavitación^{12,13,14}.

La NAVM es infección polimicrobiana. Los agentes etiológicos son ampliamente diferentes de acuerdo a la población de pacientes en una unidad de terapia intensiva, estancia hospitalaria, y de la terapia antimicrobiana previa¹⁵.

Sin embargo las bacterias típicas en la neumonía asociada a la ventilación mecánica temprana incluye; *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* metilcilino sensible, bacilos entéricos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter species*, *Proteus sp* y *Serratia marcescens*. Las infecciones fúngicas y virales tienen baja incidencia, en huéspedes inmunocompetentes^{16,17}.

Es crucial distinguir entre los pacientes quienes solo tienen colonización de la vía aérea proximal, de quienes tienen una verdadera neumonía asociada a la ventilación mecánica, el diagnóstico definitivo de NAVM es realizado con evidencia bacteriológica utilizando un cultivo cuantitativo.

Por lo que existen investigaciones que postulan que la toma de la tinción de Gram y cultivos de las secreciones obtenidas por técnicas como lavado broncoalveolar, aspiración traqueal pueden proveer la identificación temprana de pacientes con NAVM y mejorar la evolución^{18,19,20,21}.

La tinción de Gram debe su nombre al bacteriólogo Danes Christian Gram que desarrollo la técnica en 1884. Divide a las bacterias en dos grandes variedades de células.

Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa; así pues, la composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana. Posteriormente, se coloca lugol, el cual sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona, la cual deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-acetona. Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano.

Por último, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.

A partir de la tinción de Gram pueden distinguirse varios morfotipos distintos: Los cocos son de forma esférica. Pueden aparecer aislados después de la división celular (*Micrococcos*), aparecer por pares (*Diplococcos*), formar cadenas (*Streptococcos*), o agruparse de manera irregular (*Estafilococcos*).

Los bacilos poseen forma alargada. En general suelen agruparse en forma de cadena (*Streptobacilos*) o en empalizada. También pueden distinguirse los espirales, que se clasifican en espirilos si son de forma rígida o espiroquetas si son blandas y onduladas. Si por el contrario, poseen forma de "coma", o curvados, entonces se les designa vibrios ²².

La tinción de Gram del lavado broncoalveolar provee células y secreciones de una gran área del pulmón puede ser examinada microscópicamente inmediatamente, para detectar la presencia o ausencia de bacterias intracelulares o extracelulares del tracto de vía aérea baja ²³. También se determina si la muestra es adecuada, (definida por la presencia de >25 neutrófilos y <10 células escamosas por campo) ²⁴.

El criterio microbiológico para diagnóstico de neumonía asociada a la ventilación mecánica es usado para diferenciar de la colonización bacteriana de una NAVM ²⁵, este con base a un punto de corte de 10^6 U.F.C/ml obtenidas por la aspiración endotraqueal, de 10^4 U.F.C/ml de la muestra de lavado broncoalveolar y de 10^3 U.F.C /ml de la muestra con cepillado bronquial protegido.

Usualmente en la práctica médica, en los pacientes quienes se sospecha que tienen una NAVM se les inicia terapia empírica, sin embargo existe en algunos casos el riesgo de encontrar organismos multidrogoresistentes, que podrán ser parcialmente cubiertos hasta que se obtengan los resultados finales de los cultivos, o bien realizar una desescalación (reducción en el espectro de antimicrobianos) ²⁶.

El diagnóstico temprano y oportuno es crucial para proveer la adecuada terapia antimicrobiana que brindará un mejor pronóstico ²⁷

MARCO DE REFERENCIA.

En el año 2006, Veinstein y col.²⁸, realizaron un estudio observacional de 76 pacientes, con el objetivo de validar un diagnóstico y tratamiento. Realizando un algoritmo basado en el examen directo de muestras de aspirado endotraqueal y cepillado bronquial protegido en pacientes con sospecha de NAVM. Utilizaron los resultados de la tinción de Gram para iniciar el tratamiento empírico en dichos pacientes hasta que fuera disponible el resultado de los cultivos. Los resultados fueron que el tratamiento temprano fue apropiado en el 80% de los pacientes y que el 83% recibieron un esquema antimicrobiano correcto.

En el 2008 en Canadá, se realizó un estudio retrospectivo multicentrico controlado, cuyo objetivo fue evaluar la relación entre la tinción de Gram del aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar y el resultado final del cultivo en pacientes con sospecha de neumonía asociada a la ventilación mecánica, en la unidad de cuidados intensivos. El número de muestra fueron 705 pacientes. La correlación entre la tinción de Gram y el organismo encontrado por cultivo fue del 55%. Concluyeron que la tinción de Gram es un pobre predictor para el resultado final por cultivo.²⁹

En Estados Unidos de Norteamérica en el año 2012, se realizó un meta-análisis (estudios retrospectivos, aleatorizados controlados, y estudios de cohorte prospectivos fueron incluidos). Su objetivo fue estudiar el rol de la tinción de Gram para el diagnóstico de NAVM, y la correlación con el resultado final del cultivo. Utilizaron el índice Kappa para la medición de la correlación entre la tinción de Gram y el resultado subsecuente del cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que la sensibilidad de la Tinción de Gram para el diagnóstico de NAVM fue 0.79 (95% de intervalo de confianza, 0.77-0.81; $P < .0001$) y la especificidad fue 0.75 (95% de intervalo de confianza, 0.73-0.78 ; $P < .0001$). Concluyeron entonces que una tinción de Gram no podrá ser utilizada para iniciar una terapia antifécciosa hasta que los resultados de cultivo sean disponibles.³⁰

Recientemente en 2013, en la ciudad de Kioto, Japón. Se realizó un estudio retrospectivo en una población de pacientes de terapia intensiva con sospecha clínica de NAVM, en donde se comparó el resultado semi-cuantitativo de la tinción de Gram o resultado de cultivos con los resultados cuantitativos de los cultivos del aspirado endotraqueal para el diagnóstico de NAVM, se utilizaron 136 muestras de 51 pacientes. Los resultados mostraron que las muestras semi-cuantitativas (tinción de Gram o cultivos) tuvieron significativa correlación con el valor de los resultados cuantitativos de los cultivos. Con una sensibilidad 95% y especificidad 61%. Concluyeron que la ausencia de bacterias en la muestra semi-cuantitativa de tinción de Gram y un pobre crecimiento en el cultivo semi-cuantitativo podrá ser utilizado para la exclusión de la posibilidad de NAVM .³¹

Apoyado estos estudios, realizaremos un estudio para obtener la correlación del número de microorganismos en la tinción de Gram versus el número de microorganismo cuantificados en el cultivo, ya que la tinción de Gram de las muestras obtenidas de pacientes con signos y síntomas sugestivos a NAVM, provee información rápida acerca del microorganismo patógeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es la correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs cultivos cuantitativos del lavado broncoalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVVM) ?

JUSTIFICACIÓN.

La neumonía asociada a la ventilación mecánica es una común y grave infección asociada a cuidados de la salud en la unidad de cuidados intensivos. El diagnóstico se realiza con criterios clínicos (signos y síntomas) sugestivos en pacientes con intubación endotraqueal.

En la actualidad se realiza aspirado endotraqueal cuantitativo o un semi-cuantitativo de secreciones bronquiales, de forma invasiva o no invasiva, las cuales se examinan al microscópico directo con la técnica de tinción de Gram, a fin de incrementar la sensibilidad en el diagnóstico. Los resultados de los cultivos son disponibles a las 24-48 horas después de la incubación de las muestras.

La tinción de Gram es un método que provee información rápida de posibles microorganismos aislados en el cultivo de muestras respiratorias; algunos investigadores sugieren el incremento de la confiabilidad del examen microscópico, en la decisión del inicio de antibiótico empírico.

La terapia antimicrobiana temprana es esencial para proveer un mejor pronóstico clínico y reducir la mortalidad en la Unidad de Cuidados Intensivos.

Por lo que con dichos fundamentos, proponemos identificar la correlación cuantitativa del microorganismo en la tinción de Gram vs. el número de Unidades Formadoras de Colonias en el cultivo bacteriano.

Los resultados podrán apoyar otros estudios, para establecer la tinción de Gram como una prueba diagnóstica para la NAVM. Será un estudio prospectivo que podrá aportar conocimiento para el futuro.

OBJETIVO

GENERAL: Identificar la correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs. Cultivos cuantitativos del lavado bronquial de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica, en la unidad de cuidados.

ESPECIFICOS:

-Cuantificar en la tinción de Gram la presencia de microorganismos: Gram negativos(cocos, bacilos) y Gram positivos (cocos, bacilos, levaduras) de la muestra del lavado bronquioalveolar.

-Cuantificar en cultivos bacterianos las unidades formadoras de colonias correspondientes a la muestra de 20ml obtenida del lavado broncoalveolar.

HIPOTESIS

Hipótesis General: ¿“El número de microorganismos observados en la tinción de Gram tiene correlación con los cultivos cuantitativos del lavado bronquioalveolar para diagnóstico de neumonía asociada a la ventilación mecánica”?

Nula. No existe correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs cultivos cuantitativos del lavado bronquioalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica, en la unidad de cuidados intensivos.

Alternativa. Existe correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs. cultivos cuantitativos del lavado bronquioalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica, en la unidad de cuidados intensivos.

Diseño

Observacional analítico prospectivo transversal.

MATERIALES Y METODOS

Universo de estudio: Todos los pacientes con intubación endotraqueal en la unidad de Terapia Intensiva.

Definición de Población de estudio : Todos los pacientes de ambos sexos, con intubación endotraqueal, con signos y síntomas sugestivos a NAVM, en la unidad de cuidados intensivos del hospital general “Dr. Manuel Gea González”.

Tamaño de la muestra: Por conveniencia.

Periodo comprendido tres meses. Sin embargo se calcula que en el periodo de estudio serán aproximadamente 50 muestras.

Criterios de Inclusión.

Todos los pacientes de ambos sexos, con intubación endotraqueal con signos y síntomas sugestivos de NAVM, en la unidad de cuidados intensivos, que se les pueda tomar muestra de lavado bronquial, la cual deberá ser adecuada de acuerdo a criterios establecidos.

Criterio de selección. No aplica

Criterios de exclusión. No aplica

Criterios de eliminación. No aplica

Definición de variables

Variables principales		
Tinción de Gram		
Presencia de microorganismos (nominal dicotómica)	Si	no
Numero de microorganismo (cuantitativa de intervalo)	Número por campo	
Gram positivo		
Gram Negativo		
Levadura		
Polimofonucleares		
Cultivo	Número	
Unidades formadoras de Colonias de Gram positivos (cuantitativa de intervalos)		
Unidades Formadoras de Colonias de Gram Negativos (cuantitativa de intervalos)		
Unidades Formadoras de Colonias de Levadura (cuantitativa de intervalos)		
Variables generales		
Edad (cuantitativa de intervalos)		
Sexo (nominal dicotómica)	femenino	masculino
Método de muestreo (nominal dicotómica)	Si	No
Fibrobroncoscopio		

Descripción de cada variable :

Edad. Variable discreta.

Escala. Cuantitativa de intervalos

Definición operacional. Edad en años que tendrá el paciente en el momento del interrogatorio de acuerdo a su fecha de nacimiento.

Sexo. Variable categórica dicotómica

Escala. Nominal.

Definición operacional. Mujer paciente que pertenezca al sexo femenino.

Hombre paciente que pertenezca al sexo masculino.

Presencia de Microorganismo.

Numero de polimorfonucleares cuantificados por Tinción de Gram (microscopia directa). Variable cuantitativa de intervalo

Una muestra adecuada es aquella que cumple con los siguientes criterios: debe contener más de 25 polimorfonucleares y menos de diez células epiteliales por campo explorado con un objetivo de 10 x.

Numero de microorganismos cuantificados por Tinción de Gram (microscopia directa) . Variable cuantitativa de intervalo

Definición. En el examen directo se observan cocos, bacilos, levaduras presentes en el espécimen los cuales usualmente indican la magnitud y el tipo de respuesta inflamatoria. Se utiliza un microlitro de la muestra previamente homogenizada.

La observación al microscopio se realiza con aumento del ocular de 10x y un objetivo del 100 x. La microscopia por campo es de 0.2 micras .

Bacteria Gram negativa.

Definición Operacional. Bacteria con dos membranas (una externa y una interna) así como una capa delgada de peptidoglucano entre ambas, en el llamado espacio periplásmico. Pierden el cristal violeta y conservan la safranina (se aprecian de color rojo o rosado).

Bacteria Gram positiva.

Definición operacional. Bacteria con membrana que consiste de varias capas de peptidoglucano (formado por los azúcares N-acetilglucosamina más N-acetilmurámico y un tetrapéptido) que retienen el cristal violeta utilizado en la tinción de Gram; otros componentes de la pared incluyen redes de ácido teicoico y ácido lipoteicoico. Se observan de color azul - debido al colorante cristal violeta.

Levadura.

Hongo unicelular, algunas son saprofitas capaces de provocar fermentación alcohólica de los hidratos de carbono, otras son parasitas, facultativas u obligadas. Pueden presentar micelios. Su forma variable esféricas, elípticas y cilíndricas. Su tamaño es de 3-8micras de diámetro aproximadamente.

Numero de microorganismos cuantificados por cultivo bacteriano.

Variable cuantitativa de intervalo

Definición . El crecimiento de una población o cultivo bacteriano, se expresa en función a la masa del cultivo y al aumento del número de células, por unidad de tiempo. Recuento de viables en una placa posterior a 24- 48 horas de incubación.

Recolección de muestra de aspirado bronquioalveolar

Variable categórica nominal dicotómica.

-Con fibrobroncospio sin cepillo protegido

-Sin fibrobroncoscopio

Permite la recolección de muestras de secreciones respiratorias inferiores.

Es un procedimiento mediante el cual se introduce un catéter cubierto por un manguito de plástico flexible a la vía aérea traqueal artificial para retirar las secreciones, instilando solución fisiológica 20ml. Suprimiendo la necesidad de desconectar al paciente del ventilador mecánico para efectuar la aspiración.

Descripción de procedimientos en microbiología.

Se realizara conforme a la norma de procedimientos para la obtención de muestras de secreciones del tracto respiratorio inferior, con broncoscopia flexible (sin cepillo protegido) o técnica de aspirado con circuito cerrado de aspiración. Las muestras del tracto respiratorio inferior se deben enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología (de ocurrir algún retraso, la muestra puede mantenerse refrigerada a 4°C máximo por dos horas para evitar el sobrecrecimiento bacteriano).

En el laboratorio de microbiología se realizara la tinción de Gram y se observara: a) si la muestra es adecuada (es aquella que cumple con los criterios de contener más de 25 polimorfonucleares y menos de diez células epiteliales por campo explorado con un objetivo de 10 x),b) cuantificación de microorganismos Gram positivos y negativos, c) Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias de Gram positivos y Negativos encontradas en el cultivo posterior a 24-48 hrs. de incubación.

Metodología de la obtención de la muestra.

Técnica con aspirado con circuito cerrado. Se realiza por personal de enfermería entrenado.

1. Se retira el sistema de aspiración cerrado de su envoltura.
2. Se conecta el tubo en T a la conexión del equipo del ventilador.
3. Se conecta la conexión al tubo endotraqueal.
4. Se conecta la entrada de aspiración a la pared y se presiona la válvula de control y establece la aspiración al nivel adecuado empezando entre 80 y 100 mm Hg y libera la válvula de control.
5. Se fija el tubo en T con la mano no dominante e introduce el catéter unos 10-12 cm para limpiar la vía aérea del paciente, al hacer esto se colapsa el manguito de plástico. Se presiona la válvula de control para activar la aspiración, mantiene la válvula presionada, aspira y retira suavemente el catéter. Se instila de 20 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9% dentro del manguito y lava presionando la válvula de aspiración dentro de la entrada u orificio de irrigación.

6. Por último se gira la válvula de control hasta la posición de cerrado. La muestra debidamente membretada se recoge en contenedor estéril con cierre de rosca hermética de boca ancha.

Técnica con Broncoscopia sin cepillo protegido. Se realiza por personal médico entrenado.

Se introduce el fibrobroncoscopio en un segmento pulmonar (lóbulo medio o llingula) previo anclado de este; se instila 20ml de solución de cloruro de sodio 0.9%, y se aspira, en contenedor estéril con cierre de rosca hermética de boca ancha.

Procesamiento microbiológico:

Examen microscópico directo. Se debe homogeneizar la muestra, suavemente extender un microlitro en la lámina portaobjetos.

1. Dejar secar el frotis al aire, de preferencia dentro de una cabina de flujo laminar.

2. Fijar al calor y colorearlo por la técnica de Gram y realizar lectura.

Observar la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Una muestra adecuada es donde se observan más de 25 PMNs por campo de 10X.

Se examina con aceite de inmersión (objetivo de 100X) para identificar el microorganismo patógeno y también se anotará la presencia de otros morfotipos de interés (levaduras).

Cultivo:

El sembrado se realiza con un equipo sembrador automatizado que homogeniza la muestra y toma un volumen calibrado de 10 microlitros , realizado una distribución de la muestra en los diversos medios de cultivo .(Agar Sangre ,Agar chocolate ,MacConkey).

Lectura de las placas : posterior a la incubación a 35 – 37° C se realiza una evaluación a las 24 horas, si no hay crecimiento bacteriano dejar incubar hasta las 48 horas.

La evaluación consiste en la lectura cuantitativa de las placas, es decir recuento de colonias y se multiplicará por el factor de dilución para obtener las Unidades Formadoras de colonias por mililitro.

Se recolectaran los hallazgos observados a la microscopia directa de la tinción de Gram y resultados cuantitativos obtenidos del cultivo en la hoja de recolección de datos correspondiente.

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS. PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

TITULO. “Correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs cultivos cuantitativos del lavado broncoalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVM)”

Nombre de paciente: _____ Edad: _____

Sexo: _____

Registro

--	--	--	--	--	--

NUMERO DE FOLIO DE SECRECION BRONQUIAL _____

Tinción de Gram		
Presencia de microorganismo	Si	no
Numero de microorganismo por campo		
Gram positivo		
Gram Negativo		
levadura		
Polimorfonucleares		
Cultivo	numero	
Unidades formadoras de Colonias de Gram positivo		
Unidades Formadoras de Colonias de Gram Negativo		
Unidades Formadoras de Colonias de Levadura		
Método de muestreo	Si	No
Fibrobroncoscopio		

CALENDARIO.

- 1.- Revisión bibliográfica: 1mes (octubre)
- 2.- Elaboración del protocolo: 5 meses (octubre-marzo)
- 3.- Obtención de la información: 2 meses (abril-mayo)
- 4.- Procesamiento y análisis de los datos: 1 mes (junio)
- 5.- Elaboración del informe técnico final: 1 mes (junio)
- 6.- Divulgación de los resultados: 1 mes (julio)

Fecha de inicio: 1 octubre 2014

Fecha de terminación: 30 junio 2015

RECURSOS.

Recursos Humanos.

Investigador principal: Dr. Raymundo Rodríguez Badillo

Actividad: Supervisar, asesorar y revisar el protocolo.

Número de horas por semana : 5 horas

Investigador principal asociado: Dra. Fernández Hernández Esther Azucena.

Actividad: Revisión bibliográfica, elaboración de protocolo, verificar el registro de todos los pacientes intubados con signos y síntomas sugestivos a NAVM, supervisar el procesamiento y análisis de las muestras, obtención de información, elaboración informe técnico final.

Número de horas por semana: 10 horas

Investigador asociado:

Q.B.P. David Moncada Barrón.

Actividad en el laboratorio de Microbiología: Recepción de muestras, realización y lectura del frotis así como de la tinción de Gram, sembrado automatizado en los medios de cultivo bacteriológicos, lectura de las placas a las 24- 48hrs.

Número de horas por semana: 10 horas.

Recursos materiales.

Los recursos que se requiere adquirir son: hojas blancas, carpeta con arillos, lápices.

Recursos con los que se cuenta: sistema de succión cerrado para tubo (14Fr), trampa para aspiración de secreciones, solución salina 0.9% 50cc, jeringa de plástico 20ml. sin aguja, cubrebocas, guantes estériles.

Detalle descripción, costo y proveedor

Costo de tinción de Gram y medios de cultivos bacterianos: \$ 150

Recursos con los que se cuenta: Todos.

RECURSOS FINANCIEROS.

Desglose la cantidad erogada para cada uno de los siguientes rubros:

Cargo	Sueldo * Neto mensual	Sueldo por hora /160	Multiplique por núm hrs a la semana (1)	Multiplique por núm de semanas (2)
Especialista	25,760	161	161 x 5 :805	850 x 28 :\$23800
Residente I	11,164	69	70x 10 : 697	697x 28 :\$19516
Q.B.P	14,000	70	70x 10:700	700x 12:\$8400
				Total Recursos humanos \$51716

*Sueldo a mayo 2009

(1) Número de horas a la semana que dedica al protocolo

(2) Número de semanas que durará el protocolo

Total de Recursos Humanos	Materiales, reactivos y procedimientos	Equipo	Servicios generales	Total
Copie el total de la tabla anterior	Suma de todos los materiales	Costo de equipo de nueva adquisición	De la suma de A,B;C y D calcular el 15%	Suma de A,B,C,D
\$51,716	\$7,500	---	\$8,782	\$59,116

Los recursos se obtendrán de los ya considerados en el presupuesto anual de los servicios involucrados..

VALIDACIÓN DE DATOS.

Se evaluaron las variables cuantitativas con media y desviación estándar. Las variables cualitativas se expresaron como proporciones. La información se registró en una base de datos Excel. Se utilizaron métodos de estadística descriptiva para la caracterización de la muestra.

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Del periodo de 1 abril del 2015 a 30 mayo del 2015 se procesaron 60 muestras de lavado bronquial.

De este grupo 37 muestras (61.6%) fueron de mujeres y 23 muestras (38.3%) derivaron de hombres. Respecto a la edad promedio del grupo fue de 54.3 años (mínima 16/máxima 84). Tabla 1.

GENERO	No.	%
MUJERES	37	61,6
HOMBRES	23	38,3
EDAD	promedio	54,3
	minima	16
	máxima	84

Al realizar el análisis respecto a la tinción de Gram, en aquellas en que se documentaron microorganismos el 85% (34 muestras) desarrollo colonias en los medios de cultivo. En el 15% (6 muestras) no se evidenció crecimiento bacteriano en las placas de cultivo a pesar de haberse observado microorganismos en la evaluación de la tinción de Gram. En las muestras en las que no se observaron microorganismos por tinción de Gram (20 muestras) no hubo evidencia de crecimiento en los medios de cultivo (100%). Tabla 2

TINCION GRAM				
	NO	%	SI	%
SIN MO	20	100	0	0
POSITIVO	6	15	34	85

De igual forma cuando se evaluó la cantidad de microorganismo observados por campo posterior a la tinción de Gram se encontró lo siguiente: cuando no fueron observados microorganismos no hubo desarrollo de colonias en los medios de cultivo. En caso de presencia de microorganismos en la tinción de Gram y que hubo desarrollo en medios de cultivos, fueron observados microorganismos en

promedio de 8.84 (mínimo 1/máximo 60) y en las placas de cultivo se observaron en promedio 78.8 unidades formadoras de colonias (mínimo 6/máximo 100). En los casos en que fueron observados microorganismos en la tinción de Gram y no existió desarrollo posterior en los medios de cultivo, el promedio de microorganismos (MO) vistos por campo fue de 3.2 (mínimo 2/máximo 8). Tabla3

GRAM	PROM	RANGO	UFC	RANGO
NSOM	0	0	0	0,00
MO POSITIVO	8,84	1 a 60	78,8	6 a 100
MO NEGATIVO	3,2	2 a 8	0	0

Durante el análisis de microorganismos fue posible observar de 0 hasta 3 formas de organismos diferentes. En caso de un MO se encontraron 27 (45%) muestras, dos MO en 12 (20%) muestras, tres MO en 1 (1.6%) muestras y en 20 c(33.3%) casos no se observaron MO. Durante el análisis de la correspondencia respecto a estas características y las probabilidades de crecimiento de MO en los medios de cultivo se encontró lo siguiente: cuando no se observaron MO, no hubo desarrollo de MO en medios de cultivo (100%). Cuando se observó un MO, en el 88.8% (24 muestras) hubo desarrollo de MO y en el 11.1% (3 muestras) no hubo desarrollo de MO. Cuando dos MO fueron observados, en el 91.6% hubo desarrollo de MO y en 8.3% (1 muestras) no hubo desarrollo de MO. En el caso en que fueron observados tres MO (una muestra) no hubo desarrollo de MO (100%). Tabla4

No MO	0	%	1	%	2	%	3	%
AISLAMIENTO	0	0	24	88,8	11	91,6	0	0
NO AISLAMIENTO	20	100	3	11,1	1	8,3	1	100
TOTAL	20		27		12		1	

En relación a los MO observados en la tinción de Gram y en que hubo desarrollo de MO en los medios de cultivo cuando fue observado un MO, la correlación fue de 83.3% (16.6% no hubo correlación Gram/cultivo). Tabla 5

CORRELACION	SI	%	NO	%
1 MO	20	83,3	4	16,6

Cuando se observaron 2 MO se evidenció lo siguiente: en el 41.6% (5 muestras) hubo desarrollo de 2 MO, en el 50% (6 muestras) solo hubo crecimiento de un

MO, y en el 8.3% (1 muestra) no hubo crecimiento de MO. Cuando se correlacionó el tipo de MO vistos en el Gram con respecto al crecimiento en medios de cultivo, hubo correlación en el 75% (9 muestras) y en el 25% (3 muestras) no hubo correlación. Tabla 6

2 MO	No	%
2 Aislamiento	5	41,6
1 Aislamiento	6	50
0 Aislamiento	1	8,3
Correlación SI	9	75
Correlación NO	3	25

Cuando se realizó la correlación del tipo MO observado y el MO desarrollado fue observado lo siguiente: en casos de bacilos gram negativo (BGN) hubo correlación en el 92.8% (13 muestras) y en el 7.1% (1 muestra) ni hubo correlación. En caso de cocos Gram positivos (CGP) (1 muestra) no hubo correlación (100%). Cuando fueron reportadas levaduras (LEVA), solo en el 85% (6 muestras) hubo crecimiento de *Candida* y en el 15% (1 muestra) no hubo desarrollo de hongos. Tabla 7

CORRELACION	BGP	%	BGN	%	CGP	%	CGN	%	LEV	%
SI	0	0	13	92,8	0	0	0	0	6	85
NO	0	0	1	7,1	1	100	0	0	1	15

En los casos en que se observaron 2 MO en la tinción de Gram, en el 23% (3 muestras) hubo desarrollo del MO que se observó en mayor número en el frotis. En el 38.5% (5 muestras) se observó crecimiento de los 2 MO en la misma proporción de unidades formadoras de colonias (UFC), y en el 38.5% (5 muestras) se observó desarrollo de MO sin relación a los hallazgos en el Gram.

En una muestra se observaron 3 MO, no hubo desarrollo bacteriano en los medios de cultivo. Tabla 8

CORRELACION	No.	%
Desarrollo de MO que estuvo en mayor proporción de MO en la tinción de Gram	3	23
Desarrollo de MO en misma proporción de cuenta MO encontrados en Gram	5	38,5
Desarrollo de MO sin relación a los hallazgos del Gram	5	38,5

Cuando se analizaron las muestras en la tinción de Gram en que se observaron MO con respecto a la cantidad de leucocitos polimorfonucleares (PMN) identificados por campo, estas fueron divididas en aquellas que tuvieron menos de 25 PMN por campo y en aquellas en que se observaron más de 25 PMN por campo. En el grupo con menos de 25 PMN por campo, fueron identificados en promedio: BGP 10.5 por campo, BGN 11.8 por campo, CGP 8.7 por campo y levaduras 4.86 por campo, y hubo desarrollo promedio de 78.82 UFC. En el grupo con más de 25 PMN por campo, los hallazgos fueron los siguientes: BGP 0 por campo, BGN 9.6 por campo, CGP 9.6 por campo, CGN 0 por campo, LEVA 5.5 por campo, y de 78.5 UFC. No se evidenció diferencia significativa como parámetro de comparación la cantidad de PMN detectados.

CONCLUSION.

En este estudio, observamos que el 15% de las muestras evidenció crecimiento bacteriano en las placas de cultivo a pesar de no haberse observado microorganismos en la evaluación de la tinción de Gram, sin embargo existió correlación en un 83% el número de microorganismos observados en la tinción de Gram con los resultados cuantitativos de los cultivos finales. De los microorganismos identificados por tinción de Gram a la observación directa se identificaron hasta tres microorganismos, sin embargo en estas muestras no hubo crecimiento final en los cultivos .

En el caso de un microorganismo observado; los bacilos Gram negativos tuvieron 92.3% de correlación , los bacilos Gram positivos no tuvieron correlación (100%), y las levaduras, en un 85% tuvieron correlación. Concluimos en nuestro estudio que siempre y cuando los resultados y técnicas utilizadas sean validadas por la norma de procedimientos estandarizadas se podrá utilizar la tinción de Gram de las muestras de lavado bronquialveolar en pacientes con signos y síntomas sugestivos a neumonía asociada a la ventilación mecánica para el diagnóstico temprano e iniciar el tratamiento antibiótico antes de los resultados finales.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con las disposiciones contenidas en la Ley General de Salud, Título Quinto "Investigación para la Salud", Capítulo Único, artículo 100, fracción IV; así como del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos" Capítulo I, Disposiciones Comunes, artículo 13 que señala que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, artículos 14 fracción V, 20, 21 y 22 de dicho Reglamento; y, de conformidad con los principios éticos contenidos en la Declaración de Helsinki

Se me ha explicado que mi paciente al que yo represento como familiar y/ tutor padece de probable neumonía asociada a la ventilación mecánica por lo que se me propone que autorice para que mi paciente participe en el proyecto denominado "Correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs. Cultivos cuantitativos del lavado broncoalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVM)".

Su participación consiste en que de manera independiente a los estudios que se realizan habitualmente se le realizara: la obtención de muestras de secreciones del tracto respiratorio inferior, colocando un tubo elástico a los bronquios donde se inyecta solución de agua y luego se aspira junto con el moco existente en los bronquios, debido a que esta maniobra la realiza personal experto, el riesgo de lastimar o alguna complicación es mínima y el beneficio es que se limpia sus secreciones además que los resultados de esta investigación ayudarán a conocer más sobre este padecimiento. Los resultados de las pruebas no interferirán con la decisión de manejo y tratamiento.

Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y su participación.

Se me aclaró que yo puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte la atención de mi paciente de parte del médico o del hospital. Autorizo

la publicación de los resultados del estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará su nombre o revelará su identidad. Con fecha __/___/___, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a su participación en el proyecto, yo como tutor o familiar autorizado _____ y del paciente con nombre y número de expediente _____ acepto que entre en el estudio titulado: “Correlación entre el número de microorganismos en la tinción de Gram vs. Cultivos cuantitativos del lavado broncoalveolar de pacientes con síntomas y signos sugestivos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVM)”

Nombre y firma del paciente o
Responsable legal

Nombre, y firma del testigo 1
Dirección Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador Principal

Nombre, y firma del testigo 2

Nombre y firma de quien aplica el consentimiento informado

Este documento se extiende por triplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador, así mismo es obligatorio integrar al expediente clínico una copia del mismo, anexando una nota donde se especifique que el sujeto de estudio esta participando en el protocolo (señalando titulo y número de registro y nombre del investigador responsable). Queda entendido que la Dirección de Investigación, o los Comités podrán requerir este documento en cuanto lo consideren necesario. Este documento deberá ser conservado por el investigador responsable durante un mínimo de 5 años. Para preguntas o comentarios comunicarse con la Dra. María Elisa Vega Memije (01 55) 4000-3000 Ext 3217 Presidente del Comité de Investigación o con el Dr. Samuel Weingerz Melh, Presidente del Comité de Ética en Investigación al (01 55) 4000-000 Ext-3032.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. www.ineqi.com.mx. Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad,2012.
2. Rotstein C, Gerald E,Born A. *Clinical practice guidelines for hospital-acquired pneumonia and ventilator –associated pneumonia in adults*. Can J Infect Dis Med Microbiol 2008;19 (1): 19-53.
3. Zilbergberg M, Shorr A. *Ventilator –associated pneumonia: the clinical pulmonary infection score as a surrogate for diagnostics and outcome*. Clinical Infections Diseases 2010;51(s1) 131-135.
4. The Canadian Critical Care Trial Group.*A Randomized Trial of Diagnostic Techniques for Ventilator-Associated Pneumonia*.N Engl J Med 2006;355:2619-30
5. Luna C, Bledel I, Raimondi A. *The rol of surveillance cultures in guiding ventilator-associated pneumonia therapy*. Curr Opin Infect Dis 2014;27:184-193
6. Kalanuria a, Zai W, Mirski M. *Ventilator-associated pneumonia in the UCI*. Critical Care 2014;18 :208-215.
7. Zolfaghari P,Wyncoll D. *The tracheal tube: gateway to ventilator. Associated pneumonia*. Critical Care 2011;15: 310-315
8. Morris AC,Brittan M,Wilkinson and et al.*C5a mediated neutrophil dysfunction is RhoA dependent and predicts infection in critically ill patients*. Blood 2011,117:5178-5188.
9. Conway A,Anderson N,Brittan M. and et al. *Combined dysfunctions of immune cell predict nosocomial infection in critically ill patient*. Br J Anaesth 2013,3:10.
- 10.Rea A, Cherif N, Tuche F. *Diagnosis of ventilator –associated pneumonia: a systematic review of the literature*. Critcal Care 2008;12:56-77
- 11.American Thoracic Society, Infection Diseases Society of America: *Guidelines for management of adults with hospital acquired, ventilator associated, and healthcare associated pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med 2005,171:388-416.
- 12.Fujitani S, Cohen-Mlamed MH, Tuttle RP. *Comparasion of semi-quantitative endotraqueal aspirates to quantitative non broncoscopic bronchoalveolar*

- lavage in diagnosing ventilator associated pneumonia*. Res Care 2009, 54 (11): 1453-1461
13. Chastre J, Trouillet JL, Combes A. *Diagnostic Techniques and Procedures for establishing the microbial etiology of ventilator associated pneumonia for clinical trial: the pros for quantitative cultures*. Clinical Infectious Disease 2010;51(s1):88-92
 14. Komplas M, Kulldorf M, Platt R. *Risk of misleading ventilator –associated pneumonia rate with use gold standard clinical and microbiological criteria*. Clinical Infections diseases 2008; 46: 1443 – 1446
 15. Chastre J, Fagon JY. *Ventilator associated pneumonia*. Am J Resp Crit Care Med.2002; 165 :867-903.
 16. Hunter JD. *Ventilator associated pneumonia*. BMJ 2012,344:3325-3335.
 17. Brownback R, Thomas L, Simpson S. *Role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients*. Curr Opin Infect Dis 2014;27:322-328.
 18. Brauwer E, Jacobs J, Nieman F. *Test characteristics of acridine orange, Gram, and May-grunwald-Giemsa stains for enumeration of intracellular organism in Broncho alveolar lavage fluid*. Journal of clinical Microbiology 1999;37; 427-429
 19. Davis KA, Eckert MJ, Reed Jr RL, et al. *Ventilator-associated pneumonia in injured patients: do you Gram´s Stain?*. J Trauma 2005;58: 462-467.
 20. Brun-Buisson C, Fartourk M, Lechapt E, et al. *Contribution of blinded, protected quantitative specimens to the diagnostic and therapeutic management of ventilator-associated pneumonia*. Chest 2005; 58:462-467
 21. Blot F, Raynard B, Chachaty E. *Value of Gram stain examination of lower respiratory tract secretions for early diagnosis of nosocomial pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med 2000;162: 1731-1737
 22. Tortora, Funke and Case. *Introducción a la Microbiología*. 9na Edición 2007. Editorial Médica Panamericana
 23. Allaouchiche B, Jaumain H, Chassard D. *Gram stain of Broncho alveolar lavage fluid in the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia*. British Journal of anesthesia 1999;83: 845-849

24. Grgrurich PE, Hudcova J, Lei Y. *Diagnosis of ventilator –associated pneumonia: controversies and working toward a gold standard*. Curr Opin Infect Dis 2013;26:140-150
25. Jo BE, Miller M, P. Weinstein M. *A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)*. Clinical Infectious Disease 2013;57(4): 22-121
26. Masterton RG. *Antibiotic de-escalation*. Crit Care Clin 2011;27:149-162.
27. Rea A, Cherif N, Tuche F. *Diagnosis of ventilator –associated pneumonia: a systematic review of the literature*. Critical Care 2008;12:56-77.
28. Albert M, Friedrich J, Dphil. *Utility of Gram stain in the clinical management of suspected ventilator-associated pneumonia secondary analysis of a multicenter randomized trial*. Journal of Critical Care 2008;23: 74-81.
29. Veinstein A, Brun-Buisson C, Derrode N, et al. *Validation of algorithm based on direct examination of specimens in suspected ventilator-associated pneumonia*. Intensive Care Med 2006.
30. Horo J, Thompson D, Safdar N. *Is the Gram stain useful in the microbiologic diagnosis of VAP ? A meta-analysis*. Clinical Infection Disease 2012;55(4): 551-561.
31. Hasimoto S, Shime N. *Evaluation of semi-quantitative scoring of Gram staining or semi-quantitative culture for the diagnosis of ventilator – associated pneumonia: a un retrospective comparison with quantitative culture*. Journal of Intensive Care 2013; 1;1-12