



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL GENERAL



“GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

TÍTULO

DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS IDENTIFICADAS POR LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLEX FilmARRAY Y EL HEMOCULTIVO EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA.

TESIS

Para obtener grado de Especialista en Patología Clínica

PRESENTA

DRA. EVA GALAVIZ ESCAMILLA.

Asesor:

DR. GUSTAVO BARRIGA ANGULO

Co-Asesores:

QFB. MARGARITA SOLIS TREJO

QFB. MA. LAURA LÓPEZ ALVAREZ

QFB. EVA AURORA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ.

MÉXICO, D.F. JULIO 2015



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.

INVESTIGADORES

ASESOR:

DR. GUSTAVO BARRIGA ANGULO

Patólogo Clínico, Coordinador Clínico del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández”, Centro Médico Nacional La Raza. Tel 57245900 EXT: 23925 gustavo.barriga@imss.gob.mx

CO-ASESORES:

QFB. MARGARITA SOLIS TREJO, Química Clínica Jefa de sección de Biología Molecular, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, Laboratorio Clínico Tel. 57245900 EXT: 23925
Email: soltremm@hotmail.com

QFB. MA. LAURA LÓPEZ ALVAREZ Química Clínica Jefe de sección de Bacteriología médica, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza. Laboratorio Clínico Tel 57245900 Ext. 23925 Email: diana_laura_sol@yahoo.com.mx

QFB. EVA AURORA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, Química Clínica Jefe de sección de Bacteriología sanitaria, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, Laboratorio Clínico Tel. 57245900 EXT: 23925 Email: qfb_evaura@yahoo.com.mx

ALUMNA:

DRA. EVA GALAVIZ ESCAMILLA.

Médico Cirujano. Residente Patología Clínica, Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social. Matrícula 98366182 Tel. 55836072 Correo electrónico evagalavize7@gmail.com

DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS IDENTIFICADAS POR LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLEX FilmARRAY Y EL HEMOCULTIVO EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA.

DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO

Directora de Educación e Investigación en Salud
UMAE Hospital General “Gaudencio González Garza” CMN La Raza

DR. ELFEGO BAUTISTA CORTÉS

Coordinador de Educación e Investigación en Salud, Hospital de Infectología
“Dr. Daniel Méndez Hernández”, CMN La Raza.

DRA. MARIA DEL REFUGIO ÁLVAREZ GALÁN

Profesor Titular de la Especialidad en Patología Clínica,
UMAE Hospital General CMN la Raza.

DR. GUSTAVO BARRIGA ANGULO.

Asesor de Tesis.
Patólogo Clínico, Coordinador Clínico del Hospital de Infectología
“Dr. Daniel Méndez Hernández”, CMN La Raza.

DRA. EVA GALAVIZ ESCAMILLA

Médico Residente de Patología Clínica de tercer año,
UMAE Hospital General, CMN La Raza.

QFB. MARGARITA SOLIS TREJO

Química Clínica Jefa de sección de Biología Molecular,
Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza.

QFB. MA. LAURA LÓPEZ ÁLVAREZ

Química Clínica Jefe de sección de Bacteriología médica,
Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza.

QFB. EVA AURORA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Química Clínica Jefe de sección de Bacteriología sanitaria, Hospital de
Infectología, Centro Médico Nacional La Raza



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3502
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 16/06/2015

DR. GUSTAVO BARRIGA ANGULO

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Distribución de bacterias identificadas por Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex FilmArray y el hemocultivo en el Hospital de Infectología del Centro Medico Nacional la Raza.

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2015-3502-77

ATENTAMENTE

DR.(A). GUILLERMO CAREAGA REYNA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3502

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS.

A **Israel Matus Villa**, gracias por tu amor, comprensión y paciencia, por compartir conmigo el amor a esta profesión, por ser mi compañero de vida, escucharme, entenderme y estar siempre conmigo.

A mi **Madre**, por ser mi pilar y principal motivación para seguir adelante, por apoyar todas mis decisiones, por creer siempre en mí.

Al **Dr. Gustavo Barriga Angulo**, que abrió las puertas de su laboratorio, y me dio todas las facilidades para la realización de este proyecto, y la confianza depositada en mi persona para lograr este trabajo.

A la **Dra. Rita Gutiérrez, Dra. Silvia Rosalba Cortés, Dr. Contreras** gracias por su orientación y apoyo para realización de este trabajo.

Al personal de las áreas de Biología Molecular y Bacteriología del Laboratorio de Infectología, a la Bióloga **Ariadna Mora M.** gracias a todos por su apoyo.

A todos los **Médicos, Químicos y Personal Técnico** de laboratorio que tuvieron parte de mi formación como Médico Patólogo Clínico, gracias por compartir sus conocimientos y experiencia con nosotros los médicos residentes.

A mis compañeros médicos residentes: **Luz Cristina, Claudia Carolina, Juanita Jeanette y Juan Manuel** gracias por formar parte de mi vida estos tres años, en los que aprendí cosas buenas de ustedes, en su mayoría. Deseo lo mejor para ustedes siempre.

Finalmente, pero principalmente, gracias a **DIOS**, por el don de la vida, por sentir siempre su presencia protectora y darme la dicha de ver realizados mis sueños. Pero sobre todo por darme la oportunidad de ser útil y servir a mis semejantes.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCION.....	12
MARCO TEORICO	13
JUSTIFICACIÓN	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Volumen recomendados para hemocultivo en pacientes pediátricos	15
Tabla 2. Panel de identificación BCID FilmARRAY.....	21
Tabla 3. Hemocultivos solicitados en el periodo de estudio.....	33
Tabla 4. Frecuencia de hemocultivos por género de los pacientes.....	33
Tabla 5. Frecuencia de hemocultivos por la edad de los pacientes.....	34
Tabla 6. Diagnósticos para la solicitud de hemocultivos.....	35
Tabla 7. Resultados de la PCR múltiplex FilmArray en la identificación bacteriana.	36
Tabla 8. Resultados del hemocultivo en la identificación bacteriana.....	36
Tabla 9. Microorganismos identificados solo por el hemocultivo.....	37
Tabla 10. Muestras en las que se identificaron dos microorganismos.....	37
Tabla 11. Microorganismos identificados por grupo.....	38
Tabla 12. Frecuencia de Gram positivas identificadas.....	39
Tabla 13. Frecuencia de estafilococos.....	40
Tabla 14. Frecuencia de estafilococos resistentes a antimicrobianos.....	41
Tabla 15. Frecuencia de bacterias Gram negativas identificadas	42
Tabla 16. Frecuencia de Enterobacterias identificadas.....	43
Tabla 17. Datos estadísticos del tiempo de señal positiva de los hemocultivos.....	43
Tabla 18. Frecuencia de los tiempos de señal positiva de los hemocultivos.....	44
Tabla 19. Tiempo de análisis para identificación por el Vitek.....	45
Tabla 20. Tiempo de análisis para sensibilidad por el Vitek.....	46
Tabla 21. Tabla de contingencia de resultados de la PCR multiplex FilmArray y el hemocultivo.....	47
Tabla 22. Clasificación de Landis y Koch para interpretar el valor de Kappa.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Curva de crecimiento bacteriano.....	16
Gráfico 2. Distribución de hemocultivos por género de los pacientes.....	33
Gráfico 3. Distribución de hemocultivos por edad de los pacientes.....	34
Gráfico 4. Distribución de hemocultivos por diagnóstico.....	35
Gráfico 5. Identificación bacteriana por PCR multiplex FilmArray.....	36
Gráfico 6. Identificación bacteriana por hemocultivo.....	36
Gráfico 7. Distribución de microorganismos por grupo.....	39
Gráfico 8. Distribución de bacterias Gram positivas identificadas.....	39
Gráfico 9. Distribución de Estafilococos identificados	40
Gráfico 10. Distribución de Estafilococos con resistencia mecA.....	41
Gráfico 11. Distribución de bacterias Gram negativas identificadas	42
Gráfico 12. Distribución de Enterobacterias identificadas	43
Gráfico 13. Tempo de señal positiva de los hemocultivos.....	44
Gráfico 14. Tiempo de identificación bacteriana por el Vitek.....	45
Gráfico 15. Tiempo de análisis de sensibilidad por el Vitek	46

RESUMEN

Antecedentes

La presencia de un proceso infeccioso, como la bacteremia o sepsis es motivo frecuente de solicitud de hemocultivo, de éste depende la identificación del agente patógeno, el diagnóstico y un tratamiento oportuno no empírico. Por ello es importante conocer la frecuencia de agentes patógenos más comúnmente identificados en nuestro medio hospitalario. El hemocultivo, es la herramienta más confiable que hasta ahora existe para la identificación bacteriana; que presenta sensibilidad variable (65 al 99%), el uso de antimicrobianos puede afectar la recuperación de microorganismos y sus resultados son tardíos. Actualmente se han desarrollado métodos moleculares basados en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que han mostrado mayor sensibilidad (90-99%), que no se ve afectada por el uso temprano de antimicrobianos, y se obtiene un resultado en menor tiempo.

Objetivo

Determinar la distribución de bacterias identificadas como agentes etiológicos de bacteremia y/o sepsis mediante la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa multiplex FilmArray y el hemocultivo, y comparar ambos métodos en términos de concordancia de sus resultados.

Materiales y métodos

Analizamos 49 hemocultivos positivos, obtenidos durante el periodo de 01 de junio al 31 de julio 2015, se realizó la prueba de PCR multiplex FilmArray, y se continuó con el método ya establecido para identificación bacteriana por hemocultivo, se obtuvo la frecuencia y distribución de los agentes patógenos identificados, se compararon los resultados obtenidos en términos de concordancia, se comparó el tiempo de obtención de resultados en cada método. Realizamos el análisis estadístico de frecuencias de las variables nominales edad, sexo y diagnóstico de la población de estudio. Las pruebas se realizaron en las de las áreas de Biología

molecular y Bacteriología médica del laboratorio clínico del Hospital de Infectología. Se utilizó el sistema de análisis estadístico SPSS 19, IBM.

Recursos e infraestructura

Se contó con los recursos humanos idóneos, personal capacitado e infraestructura para dichas pruebas en las áreas de Biología molecular y de Bacteriología médica, el laboratorio de Bacteriología y de Biología molecular, los equipos e insumos necesarios, por lo que no genero costos extras al Instituto.

Aspectos éticos

En cumplimiento con la Legislación Mexicana vigente y la Declaración de Helsinki. Este estudio suponía un riesgo mínimo para los pacientes. Para lo cual se debería contar con el consentimiento informado del paciente y/o familiar responsable.

Resultados

Las bacterias Gram negativas se aislaron con mayor frecuencia en relación a las Gram positivas, las enterobacterias fueron los patógenos más comunes, de ellas la *E. coli*, se presentó en mayor proporción. La concordancia de resultados entre la PCR múltiplex FilmArray y el hemocultivo fue casi perfecta y el tiempo de emisión de resultados por la PCR multiplex FilmArray muy corto en comparación con el hemocultivo. La desventaja observada en la PCR FilmArray es que es un panel limitado a 24 patógenos, por lo que no detecta todos los microorganismos.

Conclusiones. La enterobacterias son los microorganismos más frecuentemente aislados de hemocultivos, lo que indica que el personal de salud no aplica las medidas necesarias para la prevención de infecciones nosocomiales, como el adecuado lavado de manos. La PCR multiplex FilmArray presento una concordancia casi perfecta con el hemocultivo, no identifica más bacterias que el hemocultivo, pero da un resultado más rápido, ventaja que puede ser aprovechada en un servicio de urgencias.

INTRODUCCION.

Los procesos infecciosos son motivo de solicitud importante de hemocultivos en nuestro medio hospitalario, durante el último año en el Hospital de Infectología CMN la Raza, se solicitaron 1481 hemocultivos, de los cuales solo el 18% fue positivo. Este tema ha dado pie a esta investigación, primeramente para conocer la frecuencia de los principales agentes patógenos que se aíslan a partir de hemocultivos, y además observar si la utilización de una prueba de biología molecular, la PCR multiplex FilmArray, representa alguna diferencia al comparar sus resultados con el hemocultivo en términos de concordancia. Se pretende comprobar si esta prueba identifica más bacterias en los hemocultivos positivos.

En la primera parte de este trabajo se hace una revisión de los métodos de identificación bacteriana existentes, el hemocultivo, que es método por excelencia y es la herramienta más importante para el diagnóstico microbiológico de agentes causantes de infección, en este caso bacteremias o sepsis y se hace una descripción breve de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR, y su variante la PCR multiplex que es el método empleado por la prueba FilmARRAY.

En la segunda parte se describe la metodología empleada para la realización de esta investigación, descripción de nuestra población, criterios de inclusión, no inclusión o eliminación, definición de variables, método de análisis de la información.

En la tercera parte mostramos los resultados obtenidos a partir de la realización de la PCR multiplex FilmARRAY y de los cultivos, a través de tablas y gráficos para una mejor comprensión del lector.

La cuarta y última parte se da la discusión de los resultados y las conclusiones a las que nos llevó nuestro estudio.

I. MARCO TEORICO.

Las bacteriemias y la sepsis son un problema relevante de salud pública, de importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan altas tasas de morbilidad- mortalidad. La infección nosocomial afecta entre 5 y 10% de los pacientes que ingresan a un hospital.¹ La sepsis representa un gran reto para su diagnóstico tratamiento, cuando evoluciona a choque séptico y disfunción orgánica múltiple, su mortalidad llega a ser de 27 a 59 %².

En México, los resultados de una encuesta realizada en 18 unidades de terapia intensiva mostraron que la sepsis fue una de las tres primeras causas de ingreso en 15 de estas unidades.³ En un estudio realizado de enero a junio de 2011 en el Hospital de Especialidades del CMN la Raza del IMSS, registraron 8,388 ingresos hospitalarios, con un total 815 eventos de infección intrahospitalaria, donde las bacteriemias se presentaron en 171 casos³ (20.9%). De acuerdo con la OMS las infecciones, no relacionadas a neumonía son la tercera causa de muerte en México. En el documento, SINAVE/DGE/SALUD/Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010, las septicemias se encontraban en el lugar 17 como causas de muerte.⁴

Las tasas de infecciones nosocomiales en países desarrollados son relativamente bajas, afectando a 5 al 10% de los pacientes hospitalizados. En estados Unidos, cada año son hospitalizados 35 millones de pacientes, el número estimado de pacientes que adquieren una infección hospitalaria sería de 1.75 a 3.5 millones. Cada caso se relaciona además con un incremento de 4.3 a 15.6 días de estancia intrahospitalaria.⁵

Al tener una inmensa diversidad de agentes causales, es de gran importancia la identificación del patógeno implicado. El método más empleado actualmente es el hemocultivo. En el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional la Raza, en el periodo del 01 junio del 2014 al 31 de mayo del 2015, se realizaron 1481 hemocultivos de pacientes con sospecha clínica de bacteremia y/o sepsis. Esta demanda de estudios a través del hemocultivo es lo que ha motivado en este trabajo.

Los métodos tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Recientemente se han desarrollado otras metodologías por Biología molecular que se han ido implementando en la identificación de agentes patógenos, como lo es la Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que tiene utilidad en varios campos de la ciencia y la investigación y que tiene muchas variantes, una de ellas es la PCR multiplex, que es utilizada en muchos países y se ha demostrado su utilidad en la identificación bacteriana para el diagnóstico clínico de bacteremia o sepsis.

Hemocultivos

El cultivo cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de la sensibilidad de los patógenos a antimicrobianos, facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos, y además es un método de fácil realización y bajo costo.⁶

El hemocultivo es el método más confiable de aislamiento e identificación de microorganismos a partir de muestras de sangre, se considera el método “*Gold standard*” en el diagnóstico de sepsis o bacteremia.⁷

Las guías CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute), recomiendan la toma de hemocultivos pareados para ayudar a discriminar entre organismos contaminantes y patógenos verdaderos; cuatro botellas de 10 ml (2 juegos) se deben utilizar para la evaluación inicial para detectar a cerca del 90-95% de las bacteriemias y seis botellas de 10 ml (3 juegos) se deben utilizar para detectar alrededor del 95-99% de las bacteriemias⁸. La extracción de sangre a intervalos sólo está indicada cuando es necesario para documentar la bacteriemia continua en pacientes con sospecha de endocarditis infecciosa u otra endovascular. El volumen adecuado de muestreo es el factor más importante para la detección de un organismo en el torrente sanguíneo, en particular en los adultos, ya que el 50 %

de los pacientes tienen $<1,0$ UFC / mL de sangre. Se recomienda que los cultivos de sangre de incluyen botellas de hemocultivo pareadas: aerobios / anaerobios, o sólo botellas para aerobios, es importante que se usen dos botellas para cada cultivo de sangre para garantizar adecuados volúmenes de sangre.¹²

Por lo anterior es de mucha importancia seguir las recomendaciones de la CLSI en lo que se refiere a la toma de los hemocultivos para asegurar que el resultado sea confiable¹⁰.

Existen diferentes tipos de hemocultivo, estos están diseñados para microorganismos aerobios, anaerobios, micobacterias y hongos, debido a los diferentes requerimientos de cada uno de estos microorganismos.

Dependiendo del tipo de paciente, neonato, pediátrico o adultos, requiere de un volumen recomendado de sangre, por lo que existen hemocultivo con un volumen de medio apropiados.

Hemocultivo neonatal (10ml medio) requiere inóculo de 2 ml de sangre.

Hemocultivo pediátrico (20 ml medio) requiere 4 ml de sangre.

Hemocultivo adulto (50ml-100ml medio) requiere 10ml de sangre.

Esto va a depender de las indicaciones de cada casa comercial.

Existen guías que indican el volumen de sangre dependiendo del peso del infante, Para los bebés y los niños más pequeños, el volumen de la extracción de sangre no debe ser mayor del 1% de volumen total de sangre del paciente⁸, anexo siguiente tabla:

Peso Kg	Volumen recomendado en ml
≤ 1	2
1.1 – 2	2
2.1 – 12.7	4
12.8 – 36.3	10
>36.3	10

Tabla 1. Volúmenes de sangre recomendados para obtención de hemocultivos en pacientes pediátricos

Un hemocultivo contiene un medio basal: infusión de cerebro corazón, extracto de levadura, una mezcla de cofactores, vitaminas y minerales, anticoagulante que además inhibe parcialmente la capacidad fagocítica de los leucocitos, y a ciertos antibióticos, el más usado es el polianetolsulfonato de sodio (PSS) al 0.03%, además, agua purificada con pH final de 7.3 ± 0.2 , una atmosfera controlada con anhídrido carbónico, carbón activado para inhibir antibióticos y otros compuestos: menadiona, hemina o cisteína para el desarrollo de ciertos microorganismos.

La notable transparencia de los hemocultivos, permiten ver a simple vista turbidez, cambio de color o hemólisis, o formación de burbujas de gas, esto permite sospechar el desarrollo de un microorganismo.

La cinética del crecimiento bacteriano en el hemocultivo comprende una serie de fases:

Fase Lag: fase de aclimatación a condiciones de crecimiento, síntesis de RNA y duplicación de DNA.

Fase exponencial: El número de bacterias se duplica a intervalos regulares de tiempo, bajo condiciones ideales de crecimiento con abundancia de nutrientes.

Fase Estacionaria: Se agotan los nutrientes, se acumulan desechos dañinos para las bacterias, división bacteriana y muerte están en balance.

Fase de Muerte: las condiciones no pueden sostener el crecimiento bacteriano, estas mueren por agotamiento de nutrientes y cambio en las condiciones del medio.

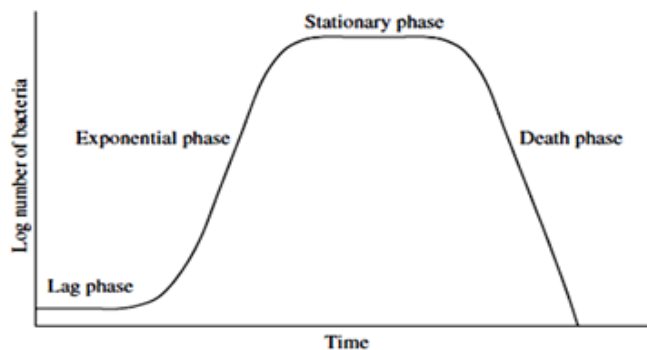


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano.

La determinación de un hemocultivo positivo actualmente es más sencillo, pues se cuenta con incubadores automatizados, que identifican los hemocultivos positivos gracias a que, los frascos del hemocultivo contienen en el fondo un colorante que reacciona con el CO₂ producido por las bacterias el cual modula la cantidad de luz que absorbe un sensor de material fluorescente del sistema automatizado, miden el nivel de fluorescencia que es equivalente a la cantidad de CO₂ liberado por las bacterias.⁹

Los sistemas de incubación automatizados más ampliamente usados para la detección de crecimiento bacteriano son: el BacT/ALERT, BACTEC y el VersaTREK. Los sistemas BacT/ALERT y BACTEC detectan la producción de dióxido de carbono de las bacterias. Todos los sistemas han sido adaptados para su uso en microbiología clínica y permiten gran cantidad de muestras para estudiar con bajos costos laborales, identificación específica de la muestra, alta sensibilidad y alta especificidad. El BacT/ALERT y BACTEC pueden identificar presencia de bacterias aerobias y anaerobias, dependiendo del medio de cultivo utilizado.¹⁰

Pero aún en presencia de sepsis, no siempre es posible obtener un cultivo positivo, sólo una tercera parte de estos son hemocultivos positivos. Esto puede ser debido a la contención local de la infección, mala sincronización de la colección, insuficiente volumen de sangre en el hemocultivo o por antibióticos administrados antes de obtenerlos.¹¹ Algunos fabricantes mencionan que la tasa de positividad aumentó en un 15-35% con hemocultivos que contienen resinas que inhiben antibióticos en pacientes ya tratados, facilitan la hemólisis y con ello la liberación de bacterias fagocitadas al medio, pero no se encontró referencia que lo demuestre.

Una vez que un hemocultivo ha dado positivo, el siguiente paso es realizar tinción Gram, que orienta sobre el tipo de medios de cultivo sólidos se deben emplear para aislar el o los patógenos existentes en la muestra, habiendo obtenido colonias puras, las características que se toman en cuenta para la identificación bacteriana son: morfología colonial, morfología del microorganismo, tipo de hemólisis y la tinción de Gram, que determina si se trata de un Gram positivo o un Gram negativo, y de ahí determinar las pruebas bioquímicas correspondientes para su total

identificación, estas pruebas pueden ser manuales (API) o utilizando un sistema de identificación automatizado como el ViTeK 2, que es el sistema utilizado en el Hospital de Infectología, este requiere de la utilización de una tarjeta específica, hay tarjetas para Gram positivos, Gram negativos y hongos.

Para realizar la identificación por sistema automatizado se realiza una suspensión con una colonia pura de bacterias en sol. salina, la cual debe tener a determinada concentración de bacterias, se toma como estándar de turbidez la unidad McFarland 0.5 que es comparable a una suspensión bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL, en el caso del Vitek 2, para Gram positivas y Gram negativas es de 0.5-0.63 McF, para las levaduras de 1.80 a 2.20 McF, *Neisseria* y *Haemophilus* de 2.70 a 3.30 McF, para anaerobios de 2.70 a 3.30 McF, estas suspensiones se usan también para analizar la sensibilidad a antimicrobianos mediante las tarjetas de sensibilidad.

Este proceso requiere de tiempo, existen factores importantes que intervienen en la recuperación de bacterias por hemocultivo, tales como: requerimientos nutricionales especiales, factores de crecimiento a base de vitaminas, minerales o aminoácidos que son necesarios en caso de microorganismos que pueden ser difíciles de recuperar debido a su lento crecimiento o no ser cultivables, otro factor es el aislamiento de la cepa, que se complica por el uso de antimicrobianos previo a la muestra, o a que no se detecta la fase exponencial de crecimiento bacteriano.

Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

En 1985, Kary Mullis inventó un método para lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico.

En 1990, los científicos alcanzan la primera amplificación y detección simultánea de las secuencias específicas de DNA usando un colorante fluorescente, estableciendo el fundamento para la PCR en tiempo real o PCR "cinético" (pruebas TaqMan). Las

aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes son prácticamente ilimitadas¹¹.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR es un método a través del cual se amplifica de manera exponencial una región determinada de un genoma de interés. La técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean. Esta técnica permite multiplicar pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces¹².

Para replicar el ADN, es necesaria una enzima, la ADN polimerasa, la más usada proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste más de dos horas a 93°C, pero existen muchas más¹³.

Para realizar la PCR es necesaria la presencia de elementos básicos:

- ADN molde (nuestra muestra)
- Enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* o *maritima*
- Primers (oligonucleotidos que reconocen secuencia en la hebra molde)
- Nucleótidos, dNTP (que darán origen a la secuencia de interés, si esta existe)
- Magnesio
- Termociclador (instrumento de proporciona variaciones o ciclos de temperatura).

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la PCR. La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos (aunque pueden llegar hasta 40 según el caso) y contenido en GC entre 40-75%.¹⁴

Para su realización in vitro, la PCR necesita al menos una pequeña fracción de cadena doble de ADN para iniciar la síntesis, la replicación del ADN es por la acción de la polimerasa, que es la enzima que dirige la síntesis de ADN, y desde una

cadena simple de ADN sintetiza la cadena complementaria. Esto se hace posible al agregar una pequeña fracción de oligonucleótidos que sean complementarios de una porción, se unirán después de la desnaturalización de la doble cadena y el crecimiento desde 5´ hacia el extremo 3´ del DNA por aposición de los nucleótidos correspondientes suministrados y, a través de la acción de la polimerasa, se hace la amplificación del fragmento deseado. Es proceso se realiza con cambios controlados de temperatura que proporciona el termociclador. La PCR se lleva a cabo en tres diferentes reacciones:

La primera reacción consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 94°C por 1 minuto o hasta 97°C. Es una etapa crítica, es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente y así pueda iniciar la síntesis de su nueva cadena complementaria.

La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C dan buenos resultados.

La tercera reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde.

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 35 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés.

PCR multiplex FilmARRAY

La PCR múltiplex es una variante en la que dos o más loci son simultáneamente amplificados en la misma reacción, en dos fases de PCR, es decir amplifica no solo una secuencia de interés sino varias, de ahí su nombre múltiplex.

Desde su primera descripción en 1988, este método se ha aplicado con éxito en muchas áreas, incluyendo análisis de deleciones, mutaciones y polimorfismos o ensayos cuantitativos y la PCR de transcripción reversa¹⁵.

En el campo epidemiológico, su importancia crece por la posibilidad de aumentar la detección simultánea de varias secuencias de ADN de microorganismos patógenos en una sola reacción.¹⁶

La PCR multiplex FilmArray es un método aprobado por la FDA, el cual cuenta con diversos paneles: Panel de identificación a partir de Hemocultivos positivos (BCID), Panel respiratorio (RP), Panel gastrointestinal (GI) y el Panel de meningitis / encefalitis (ME).

Para este trabajo se utilizó el panel BCID, para diagnóstico de Sepsis, está diseñado para la identificación 24 patógenos y 3 genes de resistencia a antibióticos asociados con infecciones del torrente sanguíneo. El tiempo en el que se realiza es de 1 hora y 5 minutos, a partir de un hemocultivo positivo El panel está diseñado para la identificación de los siguientes microorganismos:

Panel de Identificación BCID FilmARRAY			
Gram positivas	Gram negativas	Levaduras	Genes de resistencia
<i>Enterococcus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Gen mecA</i> (meticilina)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Candida glabrata</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>Enterobacter cloacae coplex</i>	<i>Candida Krusei</i>	
<i>S.aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida</i>	<i>Gen KPC</i> (carbapenem)
<i>Streptococcus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Parapsilopsis</i>	<i>Gen vanA/B</i> (vancomicina)
<i>S.agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
<i>S.pneumoniae</i>	<i>Proteus</i>		
<i>S.pyogenes</i>	<i>Serratia marcenscens</i>		
	<i>Haemophilus influenzae</i>		
	<i>Neisseria meningitidis</i>		
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		

Tabla 2. Panel de identificación BCID FilmARRAY.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran diversidad de agentes patógenos causantes de bacteriemias y sepsis, la identificación oportuna del agente etiológico es un factor que determina la conducta terapéutica a seguir, por ello es importante conocer la frecuencia en la que presentan determinados patógenos en nuestro medio hospitalario y conocer los nuevos métodos de diagnóstico que el laboratorio ofrece. El hemocultivo hasta ahora ha sido el método de elección, su sensibilidad es variable, el tiempo de emisión de un resultado puede ser hasta de 7 días, y en ocasiones no es posible recuperar el agente patógeno involucrado o identificarlo. Se han desarrollado técnicas moleculares como la PCR que a través de la identificación de material genético de bacterias, demuestran la presencia de una infección, poseen mayor sensibilidad en la identificación bacteriana y permite la obtención de un resultado en menor tiempo, lo que trae beneficios directos al paciente, evita el empleo de una terapia antimicrobiana inespecífica que contribuye a la resistencia bacteriana.

El retraso en el diagnóstico etiológico de la bacteremia y/o sepsis incrementa la morbi-mortalidad, los días de estancia hospitalaria, lo que representa más riesgo de infecciones nosocomiales y repercute secundariamente en los costos asociados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los casos de bacteremia y/o sepsis, el problema sustancial es la identificación del agente etiológico de la infección, debido a la gran diversidad de agentes patógenos, es importante conocer la frecuencia de los agentes patógenos en nuestro ámbito hospitalario, a fin de implementar las medidas preventivas para evitar su diseminación, pero lo más importante es que de su identificación depende que se ofrezca un tratamiento oportuno y específico al paciente, actualmente se cuenta con el recurso del hemocultivo, que es una herramienta muy útil para la identificación bacteriana y es un importante recurso diagnóstico, pero el tiempo de obtención de resultados en promedio es de 3 días posterior a la toma de la muestra, por lo que el inicio de un tratamiento al paciente se retrasa o se inicia de forma inespecífica. La importancia de la identificación oportuna del microorganismo implicado es fundamental. El uso de nuevas técnicas como la PCR múltiple ofrece la ventaja de reducir el tiempo en la identificación de bacterias patógenas comúnmente implicadas, da la oportunidad de un diagnóstico temprano, la identificación de más de un microorganismo cuando están presentes en la muestra, la identificación de genes de resistencia a antimicrobianos, y con esto contribuye al tratamiento específico para el agente etiológico, lo que lleva a la disminución de la resistencia bacteriana a antimicrobianos, los días de estancia hospitalaria del paciente y la morbi-mortalidad.

PREGUNTA DE INVESTIGACION.

¿Cuál es la distribución de agentes etiológicos causantes de bacteremia y/o sepsis identificados mediante la técnica de PCR multiplex FilmArray y con la técnica de hemocultivo?

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La PCR multiplex FilmArray identifica un mayor número de agentes etiológicos causantes de bacteriemia y/o sepsis en comparación de la técnica hemocultivo.

OBJETIVOS.

Objetivo General

En este trabajo pretendemos, conocer la distribución y frecuencia de las bacterias presentes en hemocultivos positivos de pacientes con sospecha de bacteriemia y/o sepsis, identificadas mediante técnicas de PCR múltiplex FilmArray y hemocultivo.

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos que derivan de nuestro objetivo principal son:

Identificar bacterias detectadas por la técnica de PCR múltiplex FilmArray que no fueron recuperadas en el hemocultivo.

Identificar bacterias recuperadas por hemocultivo y no detectadas por PCR múltiplex FilmArray.

Comparar los resultados del hemocultivo y la PCR multiplex FilmArray en términos de concordancia.

Contrastar el tiempo para la obtención de resultados entre ambas técnicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Estudio: Transversal y prospectivo.

Universo de trabajo:

El estudio se llevará a cabo en muestras de hemocultivo positivas de pacientes adultos del Hospital de Infectología del CMN La Raza, con sospecha clínica de bacteriemia y/o sepsis, durante el periodo del 01 de junio al 31 de julio del 2015.

Criterios de inclusión:

Pacientes mayores de 18 años hasta 80 años

De ambos sexos

Muestras de hemocultivos positivos

Consentimiento informado.

Criterios de no inclusión:

Pacientes que no den su consentimiento para la obtención de hemocultivo.

Muestras de hemocultivos negativos.

Hemocultivos contaminados.

Criterios de eliminación:

Muestras coaguladas, no identificadas o contaminadas o en las que se determine tres o más microorganismos.

Muestras repetidas.

Variables.

Variables demográficas, cualitativas, nominales a considerar:

Edad, sexo, diagnóstico.

Variables Independientes:

Nominal: Hemocultivo

Nominal: PCR FilmArray.

Escala de medición: concordancia de resultados o no concordancia.

Definiciones conceptuales:

- Hemocultivo: técnica de diagnóstico por laboratorio, que permite la recuperación de microorganismos en medio líquido.
- PCR multiplex FilmArray: Prueba molecular que permite la obtención de material genético, a través de diferentes secuencias blanco.

Definiciones Operacionales:

- Hemocultivo: Medio en el que es posible hacer que las bacterias presentes en las muestras de sangre, se multipliquen *in vitro*, hasta que se muestre turbidez en el medio o hasta que algún sensor incorporado en el medio cambie de color o emita fluorescencia cuando las bacterias consumen O₂ o libera CO₂.
- PCR multiplex FilmArray: Método mediante el cual se obtienen secuencias de ADN en muestras de hemocultivos positivos, a través de partículas magnéticas, que posteriormente se purifican y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, y que por medio de un sistema informático de microarreglos identifica el microorganismo del que se trata.

Variables dependientes:

Cualitativa, nominal: Bacteria

Escala de medición: presente o no presente.

Cuantitativa: Tiempo de emisión de resultado.

Escala de medición: numérica.

Definiciones conceptuales:

- Bacteria: microorganismo unicelular
- Tiempo de emisión de resultado: Número de días en dar un resultado.

Definiciones Operacionales:

- Bacteria: Microorganismo patógeno capaz de provocar un estado mórbido en un hospedero.
- Tiempo de emisión de resultado: periodo transcurrido entre la toma del hemocultivo y la identificación del patógeno.

Método de trabajo:

Se analizaron hemocultivos positivos de pacientes adultos del Hospital de Infectología, durante el periodo del 01 de junio al 31 de julio del 2015.

Una vez recibidos, se incubaron los hemocultivos a 37°C por 1 a 7 días, empleando el sistema automatizado de incubación BacTEC.

De los hemocultivos que resultaron positivos se tomó una muestra de .1 ml para PCR multiplex FilmArray. Y se continuó el proceso para el aislamiento en diferentes medios sólidos de cultivo para su posterior identificación en el sistema automatizado Vitek2.

Para cada muestra se registró:

1. Identificación de la muestra a través de un folio.
2. Datos Clínicos del paciente (formato anexo)
3. Resultado de las pruebas, (formato anexo):

Duración del estudio:

El tiempo no excederá de tres meses.

Análisis estadístico.

Análisis univariado: Se calcularán frecuencias, medidas de tendencia central y de dispersión para variables nominales continuas.

Análisis bivariado: Las variables cualitativas se compararán mediante la prueba de Kappa para determinar el valor de concordancia entre los resultados de las técnicas.

Recolección de datos.

Identificación bacteriana por PCR y Hemocultivo, Hospital de Infectología CMN la Raza.	
(Llenar claramente todos los datos requeridos)	FOLIO:
Fecha: _____ Paciente: _____ Edad _____ Sexo _____	
Cama _____ Servicio _____ Unidad: _____	
Diagnósticos Clínico: _____	
Tiempo de evolución: _____ Médico tratante: _____	
Tratamiento farmacológico: _____	
Fecha y hora de Obtención: _____ Fecha de envío: _____	

Formato del concentrado de información de los pacientes.

Folio	Edad	Género	Diagnostico
001			
002			

Codificación de datos: Genero: Femenino 1, Masculino 2, Edad: Numero bruto en años.

Formato del concentrado de resultados de las pruebas

Folio	Paciente	Género	Edad	Diagnóstico	FilmArray fecha de identificación	Microorganismo identificado	Gen de resistencia
-------	----------	--------	------	-------------	-----------------------------------	-----------------------------	--------------------

hemocultivo fecha de identificación	Microorganismo identificado	Tiempo de señal de positivo	Tiempo de identificación por el Vitek	Tiempo de análisis de sensibilidad por el Vitek	Observaciones
-------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------	---------------------------------------	---	---------------

ASPECTOS ÉTICOS.

El estudio se apoya en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud¹⁷, la declaración de Helsinki 1989¹⁸. De los cuales se determina este estudio de riesgo mínimo, solo incluye muestras de pacientes adultos de los que se obtuvo muestra de sangre por venopunción, previo consentimiento informado, cuya participación es de beneficio para su propia salud y además ayudara a la evaluación de un método de diagnóstico que permita dar un diagnóstico oportuno, evitar terapéutica de amplio espectro, evitar la resistencia bacteriana, complicaciones, estancias prolongadas, disminuye la morbimortalidad.

RECURSOS

Recursos Humanos:

Personal profesional: Químicos, QBP y técnicos del laboratorio de las áreas de Biología molecular y Bacteriología médica.

Médico residente de Patología Clínica.

Recursos materiales.

Áreas de Biología molecular y Bacteriología médica del laboratorio clínico del Hospital de Infectología y no requerirán de recursos adicionales.

Insumos: Kits FilmArray. Frascos de Hemocultivos FX, placas de cultivo, BioTec, Vitek 2.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Actividad	Ene. 2015	Feb. 2015	Mar. 2015	Abril 2015	Mayo 2015	Jun. 2015	Jul. 2015	Ago. 2015
Búsqueda bibliográfica	▲	▲	▲	▲				
Elaboración del protocolo			▲	▲	▲			
Evaluación por comité institucional					▲	▲		
Realización de las pruebas						▲	▲	
Recopilación de la información							▲	▲
Análisis de resultados								▲
Discusión								▲
Presentación de resultados								♣

RESULTADOS.

Durante el periodo de 01 de junio al 31 de julio recibimos un total 229 hemocultivos, 101 en junio y 128 en julio. Los hemocultivos positivos fueron 64 pero solo se consideraron 49 muestras que cumplieron con los criterios de inclusión, 15 no se incluyeron.

Hemocultivos solicitados durante Junio y Julio 2015		
Total de Hemocultivos	229	100%
Hemocultivos Negativos	165	72%
Hemocultivos Positivos	64	28%

Tabla 3. Hemocultivos solicitados en el periodo de estudio.

Estas muestras fueron obtenidas de pacientes, los cuales se distribuyeron por género de la siguiente manera.

Género de los pacientes

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos				
Mujer	21	42.9	42.9	42.9
Hombre	28	57.1	57.1	100.0
Total	49	100.0	100.0	

Tabla 4. Género de los pacientes de los que proceden los hemocultivos positivos.

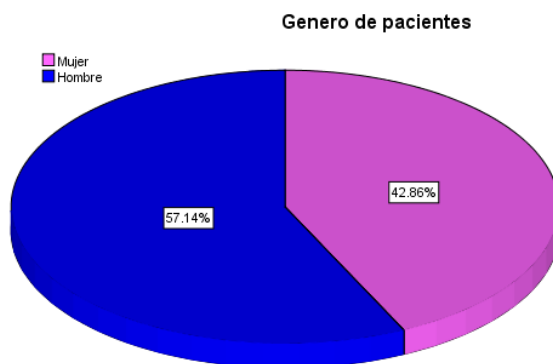


Gráfico 2. Distribución por género de los pacientes con hemocultivo positivo

Las muestras para hemocultivo procedían de hombres en un 54.5% y de mujeres en un 45.5%.

La edad de los pacientes estuvo dentro del rango de los 18 años hasta los 82 años, la media fue de 50 años, la moda de 68 años, como se muestra en la siguiente tabla y gráfica.

Edad de los pacientes

N	Válidos	49
	Perdidos	0
	Media	50.20
	Mediana	50.00
	Moda	68
	Mínimo	18
	Máximo	82

Tabla 5.Descripción de Edad de los pacientes

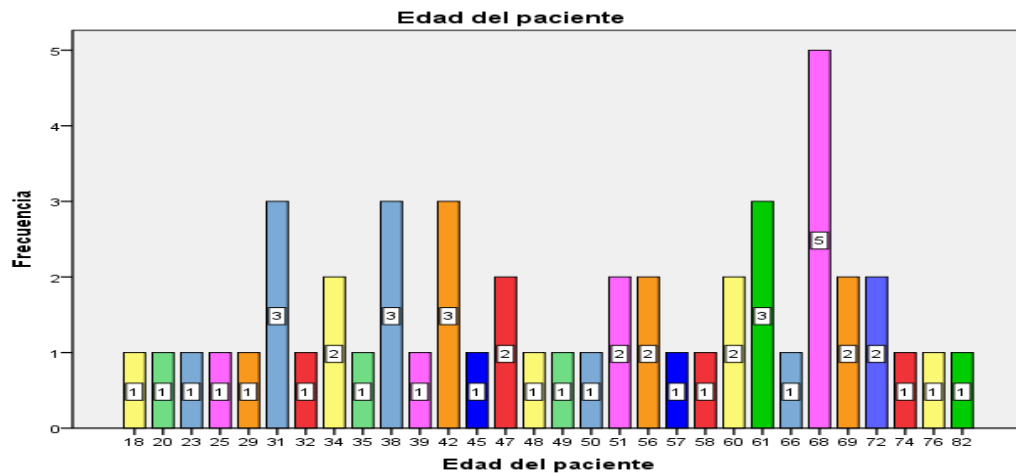


Gráfico 3. Distribución por edad de los pacientes

Encontramos que el diagnóstico más frecuente para la solicitud de hemocultivo es la sepsis en 15 casos (30.6%), seguido del síndrome febril siete casos (14.3%), la Diabetes mellitus en cinco casos (10.2%), el VIH cinco casos (10.2%), la Neumonía en cinco casos (10.2%), la IRC en cuatro casos (8.2%), heridas infectadas en 4 casos (8.2%), IVU en tres casos (6.1%) y absceso un caso (2%).

Diagnóstico por solicitud de hemocultivos

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos				
Sepsis	15	30.6	30.6	30.6
VIH	5	10.2	10.2	40.8
Síndrome Febril	7	14.3	14.3	55.1
Diabetes Mellitus	5	10.2	10.2	65.3
IRC	4	8.2	8.2	73.5
Absceso	1	2.0	2.0	75.5
Herida Infectada	4	8.2	8.2	83.7
Neumonía	5	10.2	10.2	93.9
IVU	3	6.1	6.1	100.0
Total	49	100.0	100.0	

Tabla 6. Diagnósticos más frecuentes de solicitud de hemocultivo.

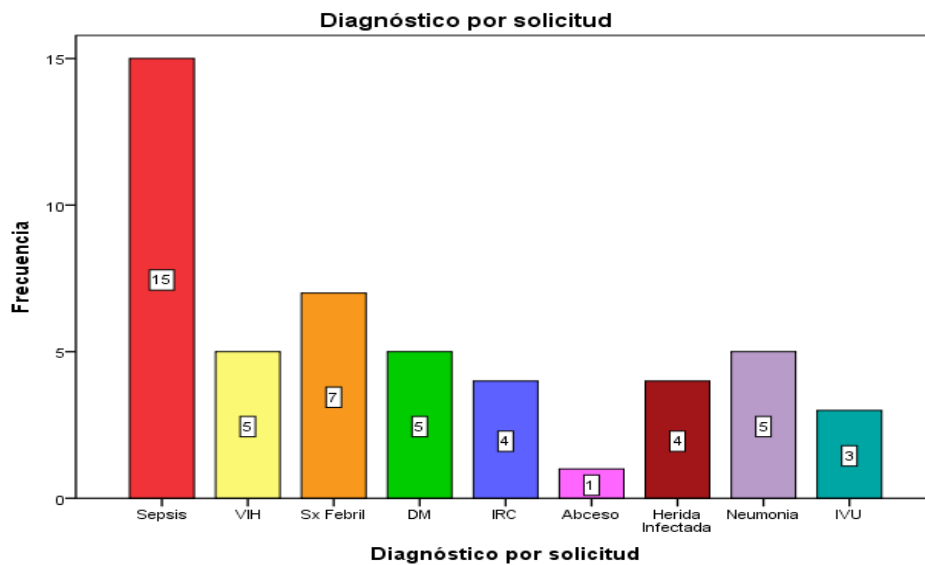


Gráfico 4. Diagnósticos más frecuentes motivo de solicitud de hemocultivo.

La identificación bacteriana de los 49 hemocultivos positivos analizados por PCR multiplex FilmArray, fue de 43 muestras (87.8%), en 6 de ellas no se logró la identificación (12.2%).

Resultados de la PCR múltiplex FilmArray

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Detectada	43	87.8	87.8	87.8
	No detectado	6	12.2	12.2	100.0
Total		49	100.0	100.0	

Tabla 7. Resultados de identificación PCR múltiplex FilmArray

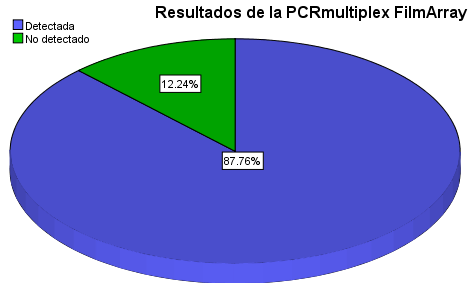


Gráfico 5. Identificación por PCRmultiplex FilmArray.

Por medio de los hemocultivos se logró identificación bacteriana en 48 muestras (97.8%) y solo uno no presentó desarrollo, no se logró identificar, por lo que represento un falso positivo (2.0%) de los 49 hemocultivos positivos.

Resultado del Hemocultivo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Recuperada	48	98.0	98.0	98.0
	No recuperado	1	2.0	2.0	100.0
Total		49	100.0	100.0	

Tabla 8. Resultados de identificación por Hemocultivo.

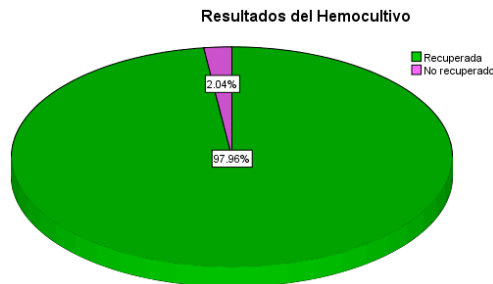


Gráfico 6. Identificación por Hemocultivo.

Se obtuvo la identificación bacteriana de los siguientes microorganismos solo por hemocultivo, que la PCR multiplex FilmArray no logro identificar. Ver tabla 9.

Microorganismos identificados solo por el cultivo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>S.maltophilia</i>	1	2.0	14.3	14.3
	<i>M.morgannii</i>	1	2.0	14.3	28.6
	<i>Lactococcus</i>	1	2.0	14.3	42.9
	<i>Criptococcus</i>	1	2.0	14.3	57.2
	<i>Bacillus sp</i>	1	2.0	14.3	71.5
	<i>Coryneacterium</i>	1	2.0	14.3	85.9
	<i>Kokuria</i>	1	2.0	14,3	100.0
	Total	7	14.0	100.0	
Perdidos	Sistema	42	86.0		
Total		49	100.0		

Tabla 9. Microorganismos identificados solo por cultivo.

Hubo 9 muestras en las que se identificaron dos patógenos presentes, de ellas la PCR multiplex FilmArray logro identificar en 8 de muestras.

Muestras donde se identificaron dos microorganismos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>S.aureus y S.marcenscens</i>	1	2.0	11.1	11.1
	<i>Streptococcus y E. coli</i>	1	2.0	11.1	22.2
	<i>E.coli y K.pneumoniae</i>	1	2.0	11.1	33.3
	<i>Kokuria y Corynebacterium</i>	1	2.0	11.1	44.4
	<i>E.coli y levaduras</i>	1	2.0	11.1	55.6
	<i>S.epidermidis y S.capitis</i>	1	2.0	11.1	66.7
	<i>E.coli y S.marcencens</i>	2	4.1	22.2	88.9
	<i>S.epidemidis y S.hominis</i>	1	2.0	11.1	100.0
	Total	9	18.4	100.0	

Tabla 10. Muestras con dos microorganismos identificados.

Identificación del patógeno por grupo.

Se identificó a las bacterias por grupos: Gram negativas, 31 casos (63.3%), dentro ese grupo las enterobacterias son las más frecuentes se presentaron en 21 casos (42.9%), el resto de Gram negativas en 10 casos (20.4%), las Gram positivas en 14 casos el 28.6%, levaduras 3 casos (6.4%).

Microorganismos identificados por grupo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Gram+	14	28.6	29.2	29.2
	Gram-	10	20.4	20.8	50.0
	Enterobacterias	21	42.9	43.8	93.8
	Levaduras	3	6.1	6.3	100.0
	Total	48	98.0	100.0	
Perdidos	Sistema	1	2.0		
Total		49	100.0		

Tabla 11. Microorganismos identificados por su grupo.

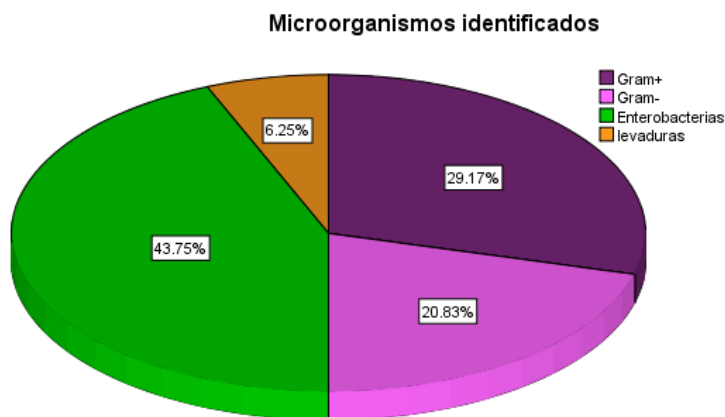


Gráfico 7. Distribución de microorganismos identificados por grupo.

Las Gram positivas son 14 casos, el 28.6% del total de 49, los más frecuentes son los estafilococos, 11 casos (78.6% del total de GP).

Bacterias Gram positivas identificadas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>Staphylococcus</i>	11	22.4	78.6	78.6
	<i>Streptococcus</i>	1	2.0	7.1	85.7
	<i>Lactococcus</i>	1	2.0	7.1	92.9
	<i>Bacillus sp</i>	1	2.0	7.1	100.0
	Total	14	28.6	100.0	
Perdidos	Sistema	35	71.4		
Total		49	100.0		

Tabla 12. Frecuencia de bacterias Gram positivas identificadas.

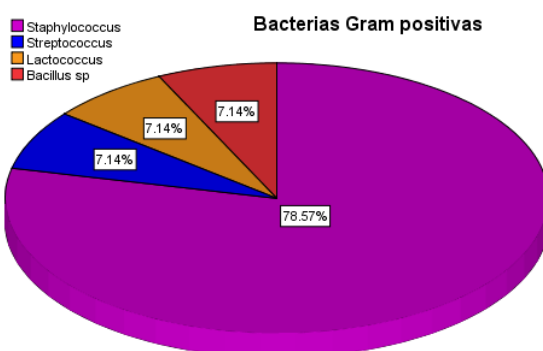


Gráfico 8. Distribución de Bacterias Gram positivas identificadas.

Del grupo de los Estafilocos, 20.5% del total de muestras, el más frecuente es el *S.aureus* en 5 casos (10.5%), el *S.epidermidis*, 4 casos (8.2%), *S. capitis* un caso (2%) y *S. hominis*, un caso (2%).

Estafilococos identificados

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>S.aureus</i>	5	10.2	45.5	45.5
	<i>S.capitis</i>	1	2.0	9.1	54.5
	<i>S.epidermidis</i>	4	8.2	36.4	90.9
	<i>S.hominis</i>	1	2.0	9.1	100.0
	Total	11	22.4	100.0	
Perdidos	Sistema	38	77.6		
Total		49	100.0		

Tabla 13. Frecuencia de Identificación de estafilococos.

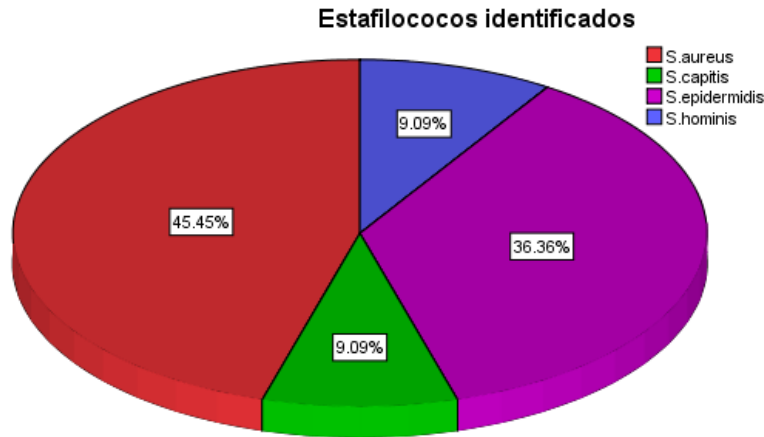


Gráfico 9. Distribución de Estafilococos identificados.

Identificación del gen *mecA*

De las 11 muestras de Estafilococos, 8 presentaron resistencia a oxacilina en el antibiograma, y se identificó por PCR el gen *mecA*: *S. epidermidis* 4 casos (8.2%) *S. aureus* 3 casos (6.15) y *S. hominis* un caso (2%).

No presentaron *mecA* 3 estafilococos: *S. capitis* un caso (2%) y *S.aureus* en dos casos (4%).

Estafilococos con gen de resistencia mecA

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>S.aureus</i>	3	6.1	27.3	27.3
	<i>S.epidermidis</i>	4	8.2	36.4	63.6
	<i>S.hominis</i>	1	2.0	9.1	72.7
	No presentan mecA	3	6.1	27.3	100.0
	Total	11	22.4	100.0	
Perdidos	Sistema	38	77.6		
Total		49	100.0		

Tabla 14. Estafilococos que presentan gen mecA identificados en los hemocultivos.

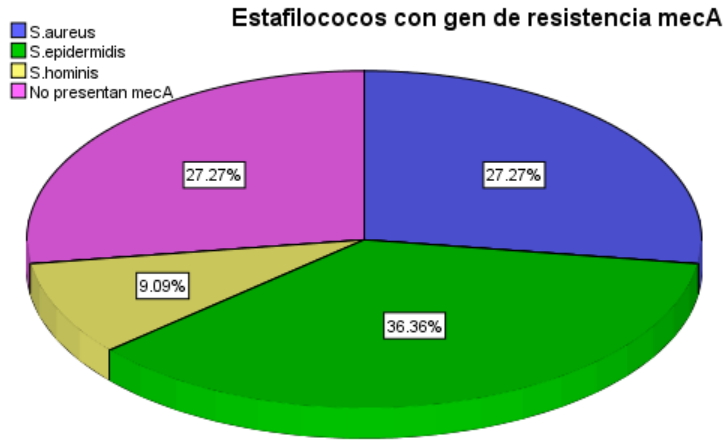


Gráfico 10. Distribución de estafilococos con resistencia mecA

Del grupo de las Gram negativas (GN) se presentaron en 33 casos (67.3%) del total de 49 hemocultivos. Las más frecuentes son las Enterobacterias en 25 casos (51.0%), el *Acinetobacter baumannii* 4 casos (8.2%) y *Pseudomona aeruginosa* en 2 casos (4,1%), *S.maltophilia* 1 caso (2.0) y *M.morgannii* 1 caso (2%)

Bacterias Gram negativas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>A.baumannii</i>	4	8.2	12.1	12.1
	<i>P.aeruginosa</i>	2	4.1	6.1	18.2
	<i>Enterobacteriaceae</i>	25	51.0	75.8	93.9
	<i>M.morgannii</i>	1	2.0	3.0	97.0
	<i>S.maltophilia</i>	1	2.0	3.0	100.0
	Total	33	67.3	100.0	
Perdidos	Sistema	16	32.7		
Total		49	100.0		

Tabla 15. Frecuencia de bacterias Gram negativas.

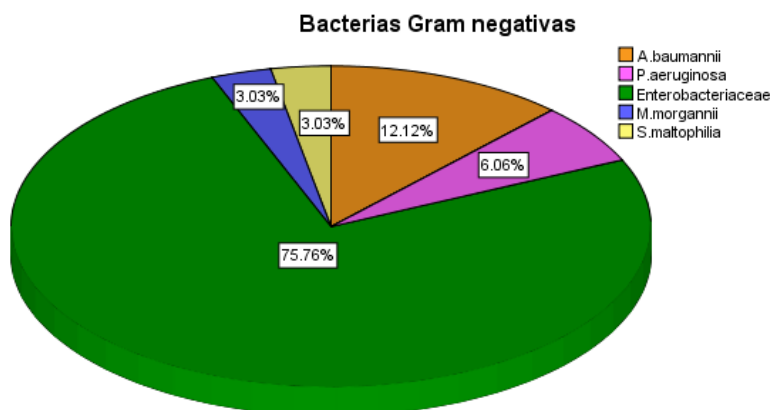


Gráfico 11. Distribución de Gram negativas identificadas.

Del grupo de las Enterobacterias 25 casos (51%) del total de 49, *E.coli*, es la más frecuente, 14 casos (28.6%), *K.pneumonie* en 8 casos (16.3%), *S.marcenscens* en 2 casos (4.1%) y *Proteus* 1 caso (2%). En el caso de las Enterobacterias, la PCR múltiple FilmArray en ningún caso identificó gen de resistencia *KPC* (de resistencia a carbapenem) o *Van A/B* (resistencia a vancomicina).

Enterobacterias identificadas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>E.coli</i>	14	28.6	56.0	56.0
	<i>K.pneumoniae</i>	8	16.3	32.0	88.0
	<i>Proteus</i>	1	2.0	4.0	92.0
	<i>S.marcescens</i>	2	4.1	8.0	100.0
	Total	25	51.0	100.0	
Perdidos	Sistema	24	49.0		
Total		49	100.0		

Tabla 16. Frecuencia de Enterobacterias identificadas.

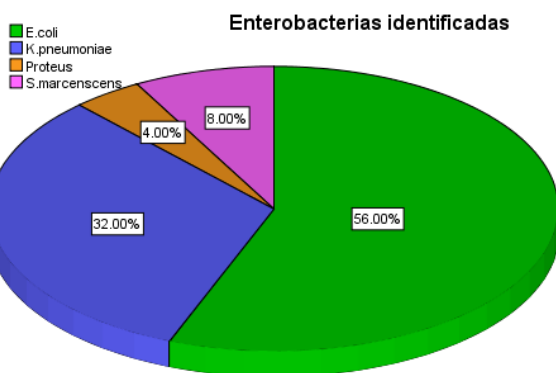


Gráfico 12. Distribución de Enterobacterias identificadas.

En el caso de las levaduras solo se identificó 4 casos, la *C. tropicalis* en dos casos (4.1%) y la *C. albicans* dos casos (4.1%). El 8.2% del total de hemocultivos analizados.

Levaduras identificadas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<i>C.albicans</i>	2	4.1	50.0	50.0
	<i>C.tropicalis</i>	2	4.1	50.0	100.0
	Total	4	8.2	100.0	
Perdidos	Sistema	45	91.8		
Total		49	100.0		

Tabla 17. Levaduras identificadas.

Un aspecto que revisamos en este trabajo fueron los tiempos en los que un hemocultivo da señal positiva, y es detectado por el sistema de incubación automatizado, encontramos que el tiempo medio es de 12 horas, pero vimos que a las 5.5 horas el 50% de los hemocultivos ya habían dado señal positiva.

Tiempo en dar señal positiva el hemocultivo en horas

N	Válidos	49
	Perdidos	0
	Media	12.43
	Mediana	5.50
	Moda	4.08
	Desv. típ.	18.75
	Mínimo	3.60
	Máximo	90.00

Tabla 18. Tiempo en dar señal positiva los hemocultivos en el BacAlert

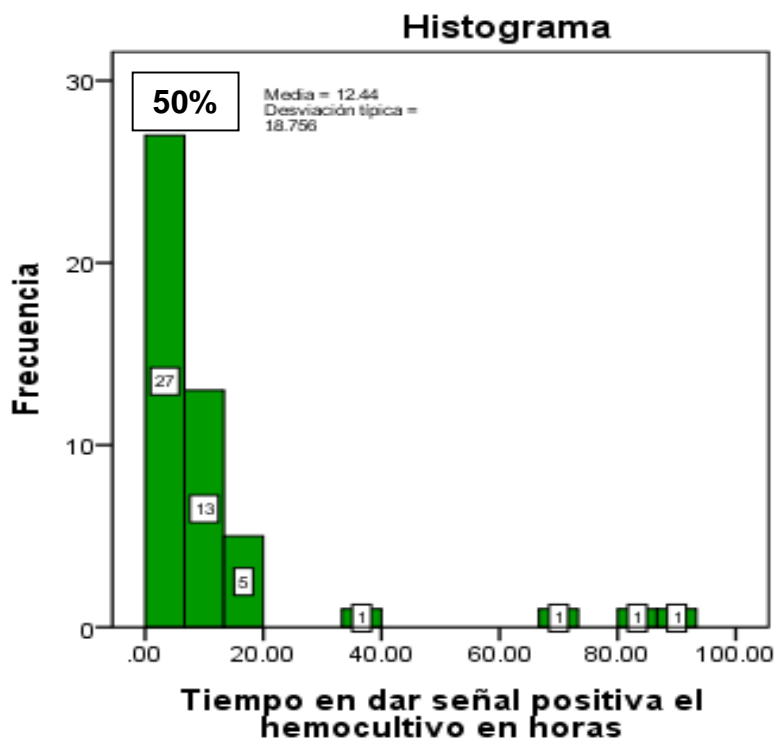


Grafico 13. Distribución de los tiempos de señal positiva de los hemocultivos.

En este gráfico observamos que la distribución de hemocultivos con señal positiva se encuentra en mayor proporción dentro de las primeras 6 horas de incubación.

Realizamos un cálculo de los tiempos que le lleva al equipo automatizado Vitek identificar un patógeno, una vez que se ha introducido la tarjeta de identificación. Encontramos que el tiempo promedio es de 4.4 horas, con un mínimo de 2.5 horas y un máximo de 6 horas.

Tiempo de análisis de identificación del Vitek en horas

N	Válidos	38
	Perdidos	11
	Media	4.46
	Mediana	4.00
	Moda	4.00
	Desv. típ.	1.06
	Mínimo	2.50
	Máximo	6.00

Tabla 19. Tiempo de análisis de identificación bacteriana por el Vitek.

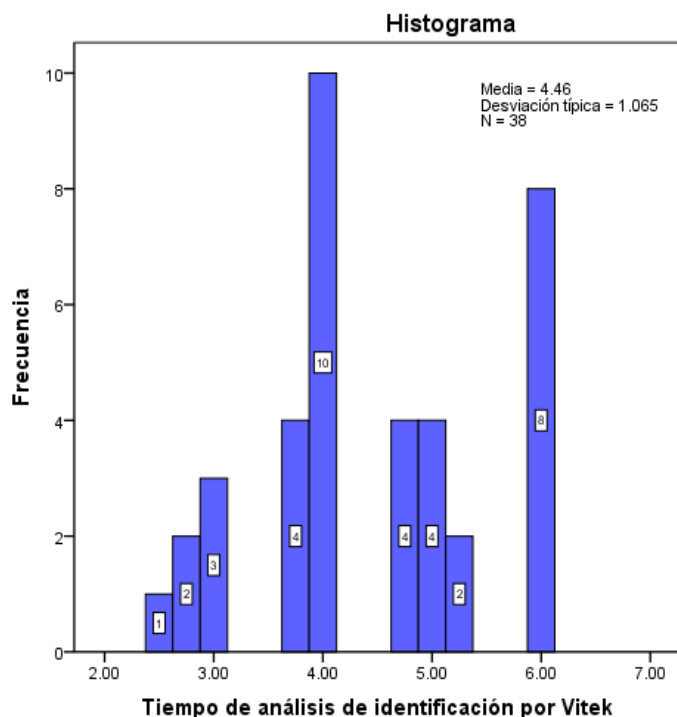


Gráfico 14. Tiempo de Identificación por el Vitek

El tiempo medio de análisis de sensibilidad a antimicrobianos por el Vitek 2, es de 9.4 horas, con un tiempo mínimo de 5 y un máximo 16 horas.

Tiempo de análisis de sensibilidad en horas

N	Válidos	38
	Perdidos	11
	Media	9.46
	Mediana	9.00
	Moda	8.00
	Desv. típ.	2.16
	Mínimo	5.00
	Máximo	16.00

Tabla 20. Tiempo de análisis de Sensibilidad por el Vitek 2.

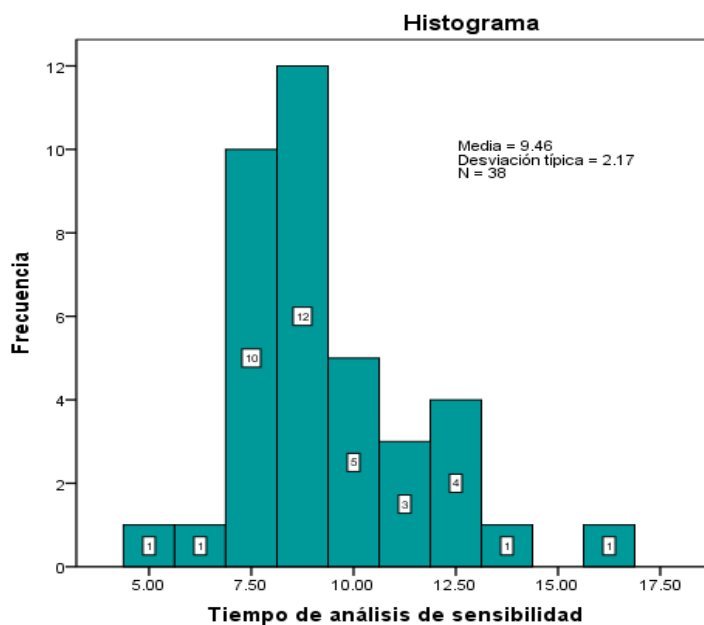


Gráfico 15. Tiempo en analizar sensibilidad el Vitek

Prueba de Concordancia de resultados de la PCR multiplex FilmArray y el hemocultivo.

Se calculó el valor de Kappa, por medio de las siguientes fórmulas:

$$PC = [(a+b)/n] * [(a+c)/n] + [(b+d)/n] * [(c+d)/n]$$

$$PO = \{a+d/n\}$$

$$K = PO - PC / 1 - PC$$

a=concordancia positiva
b=no concordancia
c=no concordancia
d=concordancia negativa

Donde, PC= Proporción de concordancia esperada producida por el azar

PO= Proporción de concordancia esperada

Tabla de Contingencia.

PCR multiplex FilmArray	Hemocultivo		
	Si identificadas	No identificadas	
Si identificadas	41	0	41
No identificadas	7	1	8
	48	1	49

Tabla 21. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos en la identificación bacteriana por los métodos de PCR multiplex FilmArray y los hemocultivos.

Valor de Kappa	
PC	0.00333195
PO	0.85714286
K	0.85047897

Interpretación del Valor de K por clasificación de Landis y Koch	
0.0	Escasa
0-0.20	Leve
0.21 a 0.40	Mediana
0.41 a 0.60	Moderada
0.61 a 0.80	Sustantiva
0.81a 1.0	Casi perfecta

Tabla 22. Clasificación de Landis y Koch para interpretar el valor de Kappa

De acuerdo al valor de Kappa obtenido: 0.85 que de acuerdo a la Clasificación de Landis y Koch: Entre los resultados del hemocultivo y la prueba PCR multiplex FimARRAY se encuentra una concordancia **Casi perfecta**.

DISCUSIÓN.

Se obtuvieron un total de 229 hemocultivos en el periodo de tiempo que abarco este trabajo, de los cuales 165 fueron negativos y 64 positivos, de éstos 15 fueron eliminados por no cumplir con los criterios de inclusión, 5 de ellos fueron hemocultivos contaminados, con más de tres patógenos identificados, que no orientan el criterio diagnóstico. Esto nos indica que uno de los puntos críticos para el análisis de un hemocultivo es la toma de la muestra, si esta no se realiza de forma adecuada es un estudio inútil y 10 fueron hemocultivos repetidos de pacientes en seguimiento.

La población de la que provenían los hemocultivos analizados en este estudio fue proporcional hombre-mujer 1:1.3, las edades muy variables en un rango muy amplio de los 18 a los 82 años, a través de los diagnósticos observamos dos tipos de poblaciones, aquellas que por una condición de inmunodeficiencia o inmuno compromiso, que están más expuestas a una infección, como lo son, los pacientes diabéticos, con insuficiencia renal, VIH, o con estancias intrahospitalarias prolongadas, en los que su misma condición de salud y la cronicidad, condiciona la presencia de infecciones graves como es el caso de los pacientes VIH que se atienden en este hospital. Y el otro grupo, que por una situación aguda quedan expuestos al riesgo de una infección como lo son los pacientes post operados, con heridas infectadas, presencia de abscesos o infecciones agudas, o que son sometidos a procedimientos invasivos: catéres, ventiladores, sondajes, etc.

En relación a la identificación bacteriana por PCR multiplex FilmArray en algunos casos solo puede identificar el género al que pertenece la bacteria, por ejemplo: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* y el gen de resistencia *mecA*, por lo que el resultado se dio como concordante, la especie fue identificada por el hemocultivo. El hemocultivo identifico prácticamente a todos los patógenos.

Determinamos la frecuencia de los principales patógenos bacterianos implicados en la etiología de la bacteremia y/o la sepsis, en el caso de las bacterias Gram positivas, los estafilococos fueron los más frecuentes *S.epidermidis*, *S.aureus* *S.hominis* y *S.capitis*, de las bacterias Gram negativas, dentro de ellas las

enterobacterias, tuvieron la más alta frecuencia como patógenos identificados en nuestro ámbito hospitalario, particularmente la *E. coli*, esto puede sugerir, que los protocolos para la prevención de infecciones nosocomiales no se llevan a cabo o que el personal hospitalario no aplica el lavado correcto de manos, que se ve reflejado en la presencia de estos patógenos.

En las muestras con dos microorganismos, la PCR multiplex FilmArray identifico en seis muestras ambos patógenos, y en tres muestras no pudo hacer la identificación, dado que esos microorganismos no están contemplados en el panel de identificación, estos fueron el *Corynebacterium*, *Kokuria*, *Lactococcus*, *Bacillus sp* que se consideran contaminantes, *Stenotrophomona maltophilia* y *Morganella morgannii* que son patógenos oportunistas intrahospitalarios que afectan a pacientes inmunocomprometidos o inmunodeficientes y que en nuestro medio si tienen importancia clínica por lo que consideramos deberían estar incluidos en el panel del FilmArray. Aun así consideramos que este panel tiene utilidad en nuestro medio hospitalario, ya que el panel incluye e identifica a la mayoría de los patógenos más frecuentes que afectan a nuestra población.

Observamos que el tiempo medio en el que un hemocultivos tenía señal positiva fue de 12 horas, y que el 50% de ellos estaban positivos las 5.5 horas, con un tiempo mínimo de 3.6 horas y el máximo de 90 horas, esto depende de muchos factores, como el tamaño de inóculo presente en la muestra, el volumen apropiado de sangre, el tiempo después de la toma de la muestra en llevarla al laboratorio y las condiciones en las que se mantuvo la muestra, que se haya registrado la fase exponencial de crecimiento antes de la incubación y por lo tanto no ser detectado, etc. Los tiempos más largos registrados correspondieron a patógenos considerados como contaminantes *corynebacterium* (90 horas), un falso positivo (82 horas) y un criptococo (72horas). La información del tiempo es importante, y puede ser útil en aquellos laboratorios de urgencias en donde hay personal las 24 horas, en cuanto se detectara un hemocultivo positivo se podría analizar inmediatamente con la PCR multiplex FilmArray y emitir un resultado más rápido, en lugar de esperar al día siguiente para ser procesado por el personal del turno matutino. También se determinó el tiempo medio en que el Vitek realiza el análisis de identificación, el

tiempo promedio es de 4.4 horas, con un mínimo de 2.5 horas y un máximo de 6 horas. El tiempo medio de análisis de sensibilidad por el Vitek 2 es de 9.4 horas, con un tiempo mínimo de 5 y un máximo 16 horas. La observación del cálculo de los tiempos, es útil para calcular el tiempo ideal aproximado de emisión de un resultado por hemocultivo en condiciones de un proceso ininterrumpido y considerando los tiempos máximos, si tomamos en cuenta que un hemocultivo da señal positiva en 12 horas, se cultiva en medio sólido y se incuba por 24 horas, se identifica en el Vitek en un máximo de 6 horas y si se analiza su sensibilidad en 16 horas máximo, esto se traduce a 52 horas, pero como se mencionó, estamos hablando de condiciones ideales. Bajo estas mismas condiciones si se compara con la prueba PCR multiplex FilmArray, en el que el resultado se obtuviera en 13 horas, la diferencia es contundente.

No podemos olvidar que el tiempo es un factor crítico en un paciente con sepsis, pues de un diagnóstico tardío se deriva el empleo de una terapéutica empírica o inespecífica, que como sabemos, favorece la resistencia bacteriana, y en consecuencia, aumenten las complicaciones del paciente, se prolonguen las estancias hospitalarias y lo más importante, aumenta la tasa de mortalidad de los pacientes con sepsis. Todo esto repercute directamente en los costos a las instituciones de salud. Es importante tomar en cuenta que a veces el resultado de un hemocultivo se da cuando el paciente se ha complicado o ha muerto.

Es por esto que el resultado de la identificación bacteriana ante la sospecha de bacteremia o sepsis, debe ser confiable y emitirse lo mas pronto posible.

Obtuvimos el grado de concordancia entre los resultados de la PCR multiplex FilmArray y el hemocultivo a través de la prueba de Kappa, que es una prueba estadística que se emplea para medir la concordancia producida por el azar, entre dos observadores, donde se obtuvo un valor de Kappa de 0.85 e interpretado se obtuvo una concordancia de resultados casi perfecta, por lo que consideramos que el FilmArray, puede ser utilizada como prueba rápida de diagnóstico a partir de hemocultivos positivos, sin olvidar, que es un panel limitado a 24 patógenos, y que siempre que no sea identificado el agente etiológico se deberá continuar con el método tradicional del hemocultivo. Una desventaja es el costo por Kit, que

posiblemente muchos laboratorios no podrían solventar, aquí cabe considerar el costo/beneficio que implica: un diagnóstico más temprano, esto se traduce en tratamientos no empíricos que reducirían la resistencia bacteriana, disminución de complicaciones al paciente, disminución de estancias intrahospitalarias y disminución de la morbi-mortalidad, que justifica totalmente la aplicación de esta prueba, la cual presenta varias ventajas, un tiempo mínimo de emisión de resultado, fácil operación y manejo de las muestras, no requiere una infraestructura especial, puede ser utilizada en un servicio de urgencias por personal no especializado. Con esto no queremos decir que debe sustituir al hemocultivo, que sigue siendo el método por excelencia, solo que es una herramienta útil para dar un diagnóstico más temprano.

CONCLUSIONES.

Se cumplió el objetivo de obtener la frecuencia y distribución de los agentes patógenos identificados por el hemocultivo y la PCR multiplex FilmArray, que se presentan en nuestro ámbito hospitalario.

Se observó que las Enterobacterias son las bacterias más frecuentemente identificadas en hemocultivos, y de ellas la *E.coli* es la que predomina, por lo tanto tenemos que hacer énfasis en que el personal de salud, aplique las medidas para prevenir infecciones nosocomiales, como lo es el lavado adecuado de manos en los cinco momentos de atención a los pacientes.

En cuanto al hemocultivo, queda claro que es un método confiable, vigente y es una herramienta diagnóstica útil, siempre y cuando la técnica de obtención de la muestra y el volumen de sangre sean los apropiados. Su principal ventaja es que puede aislar e identificar cualquier patógeno, siempre y cuando, se pueda recuperar en el hemocultivo. Su principal desventaja es el tiempo requerido para la emisión de un resultado es por menos de 72 horas.

El panel para sepsis (BCID) de prueba PCR múltiplex FilmArray, es útil en nuestro ámbito hospitalario, identifico al 88% de los patógenos presentes en hemocultivos positivos, no detecta más patógenos que el hemocultivo, por lo que nuestra hipótesis no se verifica. Su principal ventaja es que su panel detecta a gran parte de los patógenos más frecuentes en nuestro medio hospitalario y en un tiempo mucho más corto en relación al hemocultivo. Su principal desventaja: no será posible identificar otros patógenos fuera del panel para el que está diseñado.

La concordancia entre los resultados de los hemocultivos y la prueba PCR multiplex FilmArray por la prueba de Kappa fue de 0.85, interpretándose como: casi perfecta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sabatier C, Peredo R. y Valles J., Bacteriemia en el paciente crítico. *Med Intensiva*. 2009; 33 (7):336–345
2. Carrillo-Esper R, Carrillo-Córdova J. R, Carrillo-Córdova L.D., Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cir Ciruj* 2009; 77:301-308
3. López-Herrera J.R, Fernanda Méndez-Cano A, Bobadilla-Espinosa R.I, Zacate-Palacios J, Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev Inst Mex Seguro Soc* 2012; 20 (2): 85-90
4. SINAVE/DGE/SALUD/Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010.
5. Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2014; 2(31):35
6. Bou G, Fernández-Olmos A, García J.A. Sáez-Nieto C, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29(8):601–608
7. McDonald C.P. Transfusion risk reduction: Testing for bacteria. *ISBT Science Series* 2013; 8, 73–79.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2007.

9. Lloyd Townsa M, Robert Jarvisb W, Hsuehc P.R. Guidelines on Blood Cultures, *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43(4):347–349
10. Cortazar Martínez A, Silva Rincón E.P. PCR Métodos Físico-químicos en Biotecnología, Instituto de Biotecnología Universidad Autónoma de México, 2004: 15-28
11. Metzker M, Caskey C.T. Polymerase Chain Reaction (PCR), Nature Publishing Group / www.els.net
12. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, 2013; 2(2):70-78.
13. Bolivar A.M , Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización, *Avances en Biomedicina* Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica, 2014; 3(1): 25-33
14. Henegariu O, Heerema N.A, Dlouhy S.R, G.H. Vance and P.H. Vogt, Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 1997 3: 504-511.
15. Hayden M.J, Nguyen T.M, Waterman A, and Chalmers K.J. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP Genotyping, *BMC Genomics* 2008,9:80
16. Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E, La PCR múltiple en microbiología clínica, *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(3):183-92.
17. REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

18. DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MÉDICA MUNDIAL
Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.
59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.



ANEXOS: PROCEDIMIENTOS PASO A PASO

Prueba PCR multiplex FilmArray.

Paso 1. Preparación de la bolsa.



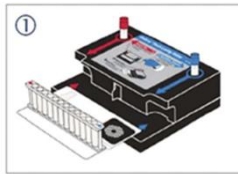
FilmArray RP Pouch

Insertar la bolsa en la estación de carga de bolsas.

- Colocar el vial de buffer en el depósito color rojo
- Colocar el vial de la solución de hidratación en el depósito azul.

Paso 2 Hidratación de la bolsa.

- Extraer 1mL de la solución de hidratación con la jeringa azul. Si hay burbujas, golpear con suavidad hasta que asciendan, mantener la jeringa en posición vertical con la punta hacia abajo. Insertar la jeringa de hidratación en el puerto de hidratación de la bolsa, fecha color azul.



Inject Hydration Solution

- Empujar con fuerza la jeringa de hidratación, en el puerto de hidratación, sin empujar el embolo.

Esperar hasta que la sol. de hidratación se introduzca en la bolsa

Paso 3. Preparar la mezcla de muestra.

- Usar una aguja calibre 28 para extraer 0.1mL de muestra del frasco de hemocultivo positivo.

Trasferir la muestra al vial de Buffer, con la pipeta de transferencia

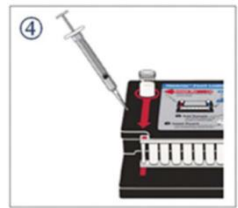
- Mezclar con suavidad haciendo subir y bajar el nivel del líquido con la misma pipeta de transferencia.



Add Sample to Buffer

Paso 4.

- Extraer 0.3 mL de la mezcla de la muestra con la jeringa roja.
- Insertar la punta de la jeringa roja en el puerto de muestra de la bolsa, color rojo.
- Sujetando la jeringa fuertemente, empujar hasta atravesar el sello del puerto, sin empujar el embolo de la jeringa.



Inject Sample

Esperar a que la mezcla de la muestra se introduzca en el interior de la bolsa

Paso 5. Analice la bolsa

- Siga las instrucciones que se muestran en la pantalla del software sonara un clic cuando la bolsa esté correctamente insertada en su sitio. Asegurarse que la tapa está totalmente abierta. Al finalizar el ensayo el software emitirá un reporte.



Load Pouch in FilmArray

Hemocultivos:

1. Obtener un mínimo de 20 mL de sangre de un brazo de ser posible antes de iniciar tratamiento antimicrobiano, siguiendo los procedimientos internacionales establecidos para su obtención en condiciones de esterilidad.
2. Inocular con jeringa un par de frascos de hemocultivo aerobios/anerobios (10mL en cada uno). O bien 2 frascos para aerobios.
3. Incubación (BacTec) a 35°C hasta detectar crecimiento. 1 a 7 días.
4. Al hemocultivo que de señal positiva: realizar tinción de Gram para decidir los medios solidos que se utilizaran sin son microorganismos Gram positivos o Gram negativos.

Tinción de Gram:

- Fijación de la muestra con calor
 - Aplicar el colorante Cristal violeta por un minuto
 - Enjuagar con agua
 - Aplicar Lugol por un minuto (mordente)
 - Lavar con alcohol-acetona (seg) Decoloración
 - Enjuagar con agua
 - Aplicar el colorante Safranina un minuto
 - Enjuagar, secar y observar al microscopio.
5. Aislamiento de microorganismos. Una vez que se ha definido si se trata de un Gram positivo o negativo en cultivos sólidos en placa. (ej. COS,CPS, PVX, SAID y CAN).
 6. Una vez que se han desarrollado las colonias puras, se observan las características de las colonias, se realiza nuevamente tinción de Gram, y se realizan pruebas bioquímicas de identificación, pueden ser manuales (API) o bien a través de sistemas automatizados(ViTek).
 7. Para la identificación bacteriana se requiere la preparación de una suspensión:

Tomar 3ml de sol. salina a un tubo y agregar una colonia del cultivo puro. Verificar la densidad óptica con un densitómetro, depende del microorganismo que se desee identificar será la densidad indicada, en microbiología los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10, por ejemplo para el sistema Vitek 2, las suspensiones para identificar Gram Positivas y Gram negativas deben ser a 0.5 -0.63 McFarland, levaduras 1.80 a 2.20 McFarland, para *Neisseria*, *Hemophilus*, *anaerobios* y *corynebacterium* 2.70-3.30 McFarland.

8. Además puede hacerse identificación de resistencia bacteriana a través de tarjetas de sensibilidad a antibióticos, automatizada con tarjetas de sensibilidad (VITEK) o manual (sensi-discos).

9. Reportar resultado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	ESTUDIO CORRELACION DE LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR MULTIPLEX VS EL HEMOCULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE SEPSIS.
Patrocinador externo (si aplica):	No Aplica
Lugar y fecha:	
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Evaluación de nueva herramienta que optimice el diagnóstico de sepsis y bacteriemia
Procedimientos:	Obtención de muestra sanguínea de 20 ml por punción venosa periférica, para hemocultivo y PCR.
Posibles riesgos y molestias:	Implica riesgo mínimo: Dolor, hematoma, infección en sitio de punción
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Dar un diagnóstico más temprano de bacteriemia o sepsis, e iniciar una terapéutica oportuna y dirigida, reducir estancias prolongadas y evitar terapéuticas empíricas innecesarias.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Se entregara el resultado de forma directa e inmediata al médico tratante
Participación o retiro:	Los pacientes deberán cumplir con los criterios de inclusión, y las muestras deberán entregarse con la información requerida completa.
Privacidad y confidencialidad:	Se aplicara en todo momento del estudio el principio de privacidad y confidencialidad.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):

Beneficios al término del estudio:

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Dr. Gustavo Barriga Angulo, Jefe de laboratorio clínico.

Responsable: HICMN La Raza

Colaboradores: Medico Residente PC Dra. Eva Galaviz Escamilla

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Clave: 2810-009-013

