



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Evaluación de un instrumento automatizado para siembra de orina.

TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

I.B.I Lucía Sánchez Zambrano

CIUDAD DE MÉXICO

2018



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.

Jurado asignado:

Presidente M. en C. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre

Vocal Dr. Luis Manuel Perea Mejía

Secretario M. en C. María Guadalupe Ortiz López

1er. Suplente Dr. Gonzalo Castillo Rojas

2° Suplente EBC. Virginia Martínez Bezies

Trabajo realizado en el Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio Clínico en el área de microbiología.

Asesor del Tema:

M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta

Sustentante:

I.B.I Lucía Sánchez Zambrano

AGRADECIMIENTOS

En primer instancia deseo expresar mi agradecimiento a mi tutora, M. en F. María del Consuelo Velázquez Acosta, por el apoyo incondicional brindado para llevar a cabo este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología. Gracias por la confianza ofrecida desde el inicio hasta el final de éste.

Asimismo, agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo profesional y humano, especialmente a Q.B.P Sugehily Zarco Márquez quien me ha compartido ideas y demostrado apoyo incondicional en este trabajo.

Pero sin duda alguna un trabajo como este no hubiese sido posible sin el apoyo vital de las personas que me estiman, sin el cual no tendría la fuerza que me anima a crecer como persona y como profesional.

Gracias a mi familia, a mis padres, hermanos y amigos, que siempre me dan un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles y a lo largo de mi vida profesional.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar un sistema automatizado de siembra en muestras de orina y su concordancia con la siembra manual basada en el recuento semicuantitativo de colonias.

Material y Métodos: Para llevar a cabo la evaluación fue necesario realizar la selección de un patrón de dispersión adecuado para siembra de muestras de orina entre 6 diferentes patrones disponibles, utilizando suspensiones bacterianas en solución salina estéril (ID BD 4.5 mL) de cepas ATCC de *Escherichia coli* (Sol. 1) y *Staphylococcus aureus* (Sol. 2) a 0.5 en escala Mc Farland de Sol. 1 y Sol. 1 + Sol. 2 (Mezcla 1), diluyendo en serie 1:10 en solución salina las cuales oscilaban entre 1.5×10^4 - 1.5×10^8 UFC/mL sembradas de forma individual y automatizada en Kiestra InoquIA BD™ utilizando medios de cultivo solidos de agar con 5% de sangre de carnero (A), cromogagar orientador (B) y agar Mac Conkey (C) solo en caso de Sol. 1, mediante una matriz de decisiones se seleccionó el patrón de dispersión adecuado para este tipo de muestra. Para la interpretación semicuantitativa de cultivos de orina (urocultivos) se realizó una plantilla sobre el patrón seleccionado en el paso anterior, usando suspensiones bacterianas en ID BD 4.5 mL con cepas ATCC de Sol. 1, *Klebsiella pneumoniae* (Sol. 3), y *Enterococcus faecalis* (Sol. 4), partiendo de 0.5 escala Mc Farland de forma individual cada una de las soluciones, se realizó una dilución 1:3 posteriormente se realizaron diluciones en serie 1:10 para obtener 0.5×10^5 UFC/mL (T2) equivalente al criterio establecido en NOM-045-SSA2-2005 para la interpretación semicuantitativa de cultivos de orina positivos, además se trabajaron las concentraciones 0.5×10^4 (T3), 0.5×10^8 UFC/mL (T1), cada concentración fue sembrada de forma individual por triplicado en Kiestra InoquIA BD™ sobre medios de cultivo solido Sol 1 y 3 en medios A, B y C, y Sol. 4 en solo en A y B, basado en características cualitativas se dividió la caja en 9 zonas de desarrollo y se crea la platilla de interpretación semicuantitativa. En la evaluación de procesaron 248 muestras conservadas en tubo tapón gris BD C&S provenientes de pacientes de hospitalización y consulta externa del Instituto Nacional de Cancerología, inoculándose con el método convencional (MC) inoculando 1 µL y 10 µL, en paralelo en Kiestra InoquIA BD™ sembrados en medios de cultivo solidos A y C, la interpretación en MC se realizó con conteo semicuantitativo y en Kiestra InoquIA BD™ se utilizó la plantilla cualitativa generada en este trabajo. Se comparó los resultados por ambos métodos y se calculó el nivel de concordancia mediante el índice Kappa. En la evaluación de aislamiento se realizó un conteo de colonias bien definidas y se calculó en porcentaje de MC y Kiestra InoquIA BD™ comparando los resultados entre ambos métodos, con el fin de evaluar si existía evidencia de contaminación cruzada, se compararon los resultados negativos y positivos entre ambos métodos, en casos positivos se realizó identificación de los microorganismos presentes en MC se identificó con Phoenix BD y en Kiestra InoquIA BD™ se realizó una identificación rápida en MALDI – TOF, comparando los resultados, se realizó la comparación en tiempo de proceso entre ambos métodos.

Resultados: El patrón de dispersión 9 se eligió como el adecuado para muestras de orina con una calificación de 9.0 resultado de la matriz de decisiones. La plantilla realizada para la interpretación de resultados positivos mostró el punto de corte entre zona 3 - 4 apegándose a criterios establecidos siendo reproducible sin diferencia entre medios de cultivo y microorganismos utilizados. Las muestras fueron analizadas y comparadas por ambos métodos, hallándose un índice Kappa de 0.989, siendo considerada una concordancia “Casi perfecta”. Kiestra InoquIA BD™ mostró una capacidad de aislamiento mayor con 95% de los cultivos con buena recuperación de colonias aisladas y mayor recuperación de microorganismos. Finalmente en la evaluación de contaminación cruzada la identificación de microorganismos fue coincidente en todos los casos y no presento evidencia de contaminación cruzada, el ahorro de tiempo demostrado fue de 72%.

Conclusión: Kiestra InoquIA BD™ ofrece diferentes patrones de dispersión permitiendo que el usuario elija el que mejor se adapte a sus requerimientos según tipo de muestra, es posible interpretar cuentas semicuantitativas realizando plantillas sobre el patrón de dispersión usado, el cual es reproducible gracias al uso de pipeta para inculo. La concordancia obtenida entre ambos métodos indica que Kiestra InoquIA BD™ es un equipo automatizado con alta confiabilidad para el proceso de inoculación y siembra, mostrando que tiene el potencial de permitir la automatización y estandarización del proceso en muestras de orina, el equipo muestra una mejor recuperación de colonias aisladas en comparación con MC, no presenta evidencia de contaminación de la muestra en el proceso, reduce tiempo en proceso, ofrece resultados confiables lo cual repercute favorablemente en la recuperación del paciente, su tratamiento, estancia de hospitalización y costos que éstos generen.

Palabras clave: Siembra de orina, sistema automatizado, evaluación, índice kappa, aislamiento de colonias, estandarización.

Abreviaturas:

IVU: Infecciones en Vías Urinarias

MC: Método Convencional

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

ATCC: American Type Culture Collection

INCan: Instituto Nacional de Cancerología

BD: Becton Dickinson

A: Agar con 5% de sangre de carnero

B: Cromo agar orientador

C: Agar Mac Conkey

µL: Microlitro

MI: Manual interaction (interacción manual)

FA: Full automatic (totalmente automático)

Sol. 1: Suspensión bacteriana con solución salina estéril ATCC 28922 *Escherichia coli*

Sol. 2: Suspensión bacteriana con solución salina estéril ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*

Sol. 3: Suspensión bacteriana con solución salina estéril ATCC 700803 *Klebsiella pneumoniae*

Sol. 4: Suspensión bacteriana con solución salina estéril ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
I.- INTRODUCCIÓN.....	7
II.- ANTECEDENTES.....	13
Procesadores automatizados	15
Procesador de muestras Kiestra InoquIA BD™	16
III.- JUSTIFICACIÓN	17
IV.- HIPÓTESIS	17
V.- OBJETIVO GENERAL.....	17
VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
VII.- MATERIALES Y MÉTODOS	18
Fase 1. Selección de patrón de dispersión.	18
Fase 2. Zonas de desarrollo microbiano en caja Petri que facilitará la lectura de urocultivos positivos de manera semicuantitativa.	21
Fase 3. Evaluación de siembra en muestras de orina.	22
Correlación entre métodos MC vs. Kiestra InoquIA BD™	23
Evaluación de aislamiento	23
Evaluación de contaminación cruzada	24
Evaluación de tiempo empleado para siembra entre método MC vs. Kiestra InoquIA BD™	24
VIII.- RESULTADOS.....	25
Fase 1.- Selección de patrón de dispersión.	25
Fase 2.- Zonas de desarrollo microbiano en caja Petri.....	35
Fase 3.- Evaluación de siembra en muestras de orina.....	38
Correlación entre MC y Kiestra InoquIA BD™	38
Capacidad de aislamiento MC vs. Kiestra InoquIA BD™	41
Evaluación de contaminación cruzada.....	43
Evaluación de tiempo de siembra con MC vs. Kiestra InoquIA BD™	43
IX.- DISCUSIÓN.....	44
X.- CONCLUSIONES	46
XI.- BIBLIOGRAFÍA	47
XII.- ANEXOS.....	50

Anexo 1. Técnica de inoculación para muestras de orina (urocultivo).	50
Inoculación en placas de agar	50
Los criterios descritos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.	51
Anexo 2. Recolección de muestra	52
Recolección de muestra chorro medio	52
Recolección de muestra directo de catéter:	52
Recolección por punción suprapúbica:	52
Recolección de sonda:.....	52
Anexo 3. Características de patrones de dispersión.	53
Anexo 4. Características de Medios de cultivo utilizados.....	54
Características de agar + 5% sangre de carnero.	54
Cromo agar orientador.....	54
Agar Mac Conkey.....	55
Anexo 5. MALDI TOF	56
Descripción del proceso (MALDI TOF).....	56
Anexo 6. Phoenix metodología.	57
Inoculación manual de panel de identificación BD Phoenix	57
Anexo 7. Correlación entre muestras procesadas en MC y automatizada con Kiestra Inoqula BD™	58
Calculo de tamaño de muestra.	58
Anexo 8. Grado de concordancia Índice de concordancia Kappa.....	59
Valor del grado de acuerdo	59

I.- INTRODUCCIÓN

La microbiología clínica tiene como objetivo identificar el agente etiológico de una infección y determinar la susceptibilidad antimicrobiana. En el laboratorio de microbiología se lleva a cabo la etapa analítica o diagnóstico microbiológico, la cual comienza una vez recibida la muestra en el laboratorio, ésta es procesada mediante diferentes metodologías para obtener un resultado final. El primer proceso de la muestra es la siembra, teniendo como finalidad recuperar el agente etiológico causal de la infección, esperando tener colonias aisladas para su identificación y pruebas de susceptibilidad antibiótica.^[6] Existen diversas técnicas de siembra basadas en métodos convencionales (MC) de inoculación y estriado sobre placas de medio de cultivo sólido, de la cual depende el desarrollo del cultivo bacteriano, estas técnicas facilitan el recuento de colonias y su aislamiento, sin embargo difícilmente se logra una reproducibilidad y ésta presenta una variable que dependerá de la experiencia y habilidades del personal capacitado. A lo largo del procedimiento de siembra de muestra por MC existen diversos puntos críticos que pueden influir directamente en el resultado y salud del paciente, algunos difícilmente controlados como: las asas de inoculación calibradas para aportar volumen prescrito donde la exactitud puede variar con una tasa de error de $\pm 50\%$, en particular cuando se usa el asa de $1\mu\text{L}$. El muestreo vertical desde un pequeño envase puede aportar sólo un 50% del volumen prescrito; el muestreo horizontal con un ángulo 45° a partir de un envase grande puede aportar un 150% del volumen,^[11, 19] flamear el asa sin dejar enfriar lo suficiente puede alterar la presencia de microorganismos en la muestra o no flamear lo suficiente puede arrastrar agentes contaminantes, rotular las muestras de forma manual quedando expuesto a cometer errores humanos y particularmente cuando se manejan grandes volúmenes de muestras. Adicionalmente manuales de seguridad en el laboratorio de microbiología señalan

que los principales factores de riesgo físicos a los que se ve sometido el trabajador son temperaturas extremas (calor, frío), los relacionados con la ergonomía y los biológicos. En el laboratorio se realizan procesos que se desarrollan a temperaturas extremas como la utilización de mecheros en los procesos de siembra que pueden producir accidentes por sobrecalentamiento, así como quemaduras graves, fuego y explosiones. Las consecuencias de adoptar posturas corporales incómodas debido a efectuar esfuerzos repetitivos pueden provocar molestias o lesiones, sobre todo en espalda y problemas circulatorios, siendo factores importantes que puede afectar la eficacia, seguridad y bienestar del trabajador en su puesto de trabajo. Los riesgos biológicos están presentes en la manipulación de muestras quedando expuestos a exposición involuntaria al material biológico o su liberación accidental. ^[2]

A diario en el laboratorio de microbiología se reciben un gran variedad de tipo de muestras microbiológicas de diferente procedencia para su proceso como: muestras en hisopados, muestras de materia fecal, expectoraciones, aspiraciones bronquiales, hemocultivos, etc., sin embargo, las de mayor prevalencia son las muestras de orina, las cuales son analizadas para apoyo al diagnóstico de infección en vías urinarias (IVU).

Las IVU son de las más comunes, su prevalencia depende del sexo y la edad, afectando particularmente a las mujeres siendo el 80% de los casos de quienes padecen este tipo de infección. Se calcula que el 50% de la población femenina sufre alguna forma de IVU a lo largo de su vida. La infección en la población de varones permanece como un trastorno poco común hasta la quinta década de vida, cuando el incremento de volumen de la próstata empieza a interferir con el vaciado vesical presentando una tasa de incidencia de 6,000 por cada 100,000 habitantes. En personas de edad avanzada de ambos sexos la cirugía

ginecológica o prostática, la incontinencia, instrumentación y cateterismo uretral crónico, incrementan las tasas IVU hasta 30 a 40 %. ^[1] En México se reportan más de 1 millón de casos nuevos mensuales de IVU a nivel nacional según el Subsistema de Notificación de Casos Nuevos de Enfermedades, constituyendo un importante problema de salud, que origina una amplia variedad de formas clínicas y son la segunda causa de consulta médica ambulatoria en los servicios de consulta externa y urgencias, el agravamiento de la enfermedad se asocia a falla renal la cual se encuentra entre las 10 principales causas de mortalidad en el país, se estima que su tratamiento genera un gasto de millones de pesos anuales. ^[21, 23, 27, 29, 30, 31].

Una IVU es la invasión y el crecimiento en el tracto urinario de agentes infecciosos como bacterias y levaduras. ^[19] Provocando infecciones que por lo general tienen un origen bacteriano, siendo los más frecuentes; *Escherichia coli* el agente etiológico responsable del 75 a 85% de los casos y en menor proporción, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. ^[22, 21].

En pacientes que padecen cáncer y reciben tratamientos de quimioterapia pueden aumentar el riesgo de infecciones, debido a que se encuentran inmunocomprometidos y presentan neutropenia, incrementando así el riesgo de contraer una infección, constituyendo una de las causas más importantes de mortalidad en los pacientes oncológicos, una infección pone en peligro la vida del paciente requiriendo atención médica urgente. Siendo las IVU de las infecciones más comunes y recurrentes en pacientes oncológicos. ^[12, 16, 22]

El cultivo de orina (urocultivo) sigue siendo la técnica imprescindible y de elección para el diagnóstico de las IVU por lo que el laboratorio de microbiología clínica frente al diagnóstico de éstas tiene una gran responsabilidad en cumplir su objetivo, proveer información oportuna y exacta de los microorganismos recuperados en orina, ya que los médicos utilizan esa información como guía para elegir el tratamiento apropiado, monitorear la terapéutica y evaluar el curso de la enfermedad. [18, 19, 30, 33]

La orina normalmente en vejiga es estéril, sin embargo un urocultivo debe ser interpretado con recuentos semicuantitativos, dado que la uretra masculina y femenina alojan microorganismos considerados microbiota, la orina al pasar por estos conductos puede contaminarse fácilmente con bacterias de uretra, vagina y perineo en caso de pacientes femeninos debido a la proximidad anatómica, en cantidades que oscilan entre 10^2 a 10^4 /mL. [4, 21]

Para favorecer el desarrollo y aislamiento de agentes etiológicos, la técnica de inoculación y estriado usada en MC en urocultivos, se logra mediante la diseminación del inóculo sobre la superficie completa de una placa en medio de cultivo sólido, una combinación de agar con 5% de sangre de carnero como medio enriquecido y agar Mac Conkey como medio selectivo y diferencial el cual es capaz de discriminar las bacterias Gram negativas según su capacidad de fermentar la lactosa y morfología, habitualmente es suficiente para la recuperación de los agentes etiológicos comunes en este tipo de infección, aunque en algunos laboratorios es común que se utilice también como agar orientador el cual según el metabolismo de las bacterias da una coloración característica de las colonias relacionada a un microorganismo en particular, ésta varía según la casa comercial que lo distribuye, con base a eso se puede identificar el agente infeccioso, en el MC de siembra se utilizan asas de inoculación no

ferrosas (Nichrome o platino), calibradas 1 ó 10µL, con un patrón estándar para que se obtengan colonias separadas y pueda realizarse un análisis semicuantitativo. (Anexo 1) Con este método se obtiene información sobre el número de UFC/mL del microorganismo presente en la muestra donde: la siembra con asa de 1µL corresponde a; 1colonia=10³UFC/mL (10⁶ UFC /L) y 10µL donde 1 colonia = 10² UFC/mL (10⁵ UFC/L). [9,10, 11, 19, 30]

Los cultivos de orina deben ser incubados a 35±2°C en atmósfera aeróbica antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección urinaria se pueden poner en evidencia en 18-24 horas, en este contexto no tiene sentido prolongar la incubación más allá de las 24 horas. En casos determinados con sospecha de microorganismos exigentes, como levaduras, podría ser necesario extender el periodo de incubación a las 48 horas. Las placas deben ser examinadas para su valoración después del tiempo adecuado de incubación. [25]

La calidad de las muestras recibidas y el manejo previo a su recepción en el laboratorio es un punto crítico para la exactitud de los resultados obtenidos en el laboratorio de microbiología clínica teniendo gran peso la recolección adecuada de la muestra (Anexo 2). [14, 25]

Interpretar los cultivos primarios después de incubación requiere una considerable habilidad que solo personal con los conocimientos adecuados puede realizar. A partir de las observaciones iniciales, el microbiólogo debe evaluar el crecimiento de las colonias y decidir si son necesarios procedimientos adicionales. Esta evaluación se hace:

Observando las características macroscópicas: tipo de colonia, pureza de colonia, cantidad de colonias semicuantitativo >50,000 UFC/mL.

Microscopia: coloración Gram y morfología de las bacterias en cada tipo de colonia.

Metabolismo microbiano: observando cambios en el medio que rodea a las colonias y reflejan actividades metabólicas específicas de las bacterias recuperadas. ^[19]

Cultivos sin desarrollo microbiano: si las placas no presentaran crecimiento después del tiempo adecuado de incubación, el cultivo debe considerarse como negativo.

Cultivos con desarrollo microbiano: es importante discriminar entre especies con capacidad uropatógena (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, otros bacilos gramnegativos, *Enterococcus* sp., *Streptococcus* β - hemolíticos, levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, etc., de aquellas especies que generalmente representan microbiota urogenital o cutánea (*Lactobacillus* spp, difteroides distintos de *Corynebacterium urealyticum*, *Streptococcus* del grupo viridans distintos de *Aerococcus urinae* y *Bacillus* spp.) que no se considerarán valorables, aunque siempre debe considerarse en el contexto clínico del paciente. ^[30]

Un recuento de colonias $>50,000$ (0.5×10^5) UFC/mL es un criterio utilizado para determinar la positividad de un urocultivo. ^[9] Cuando el recuento de colonias es cercano a 50,000 UFC/mL o cuando se recuperan dos o más tipos de bacterias y éstas alcanzan cuenta suficiente, la decisión en cuando llevar a cabo las pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana debe tomarse sobre base individual (caso por caso). Los urocultivos obtenidos por cateterismo o punción suprapúbica habitualmente se analizan a detalle, incluso con bajos recuentos de colonias o con la recuperación de múltiples microorganismos. ^[19, 30]

II.- ANTECEDENTES

Los intentos de obtener más eficiencia en el proceso de inoculación y estriado han evolucionado lentamente desde 1882, cuando Robert Koch publicó por primera vez una técnica para el aislamiento y estudio de colonias bacterianas utilizando medios sólidos a base de gelatina sobre placas de vidrio. En ese momento Koch descubrió la inoculación y propagación de muestras utilizando agujas esterilizadas por calor. La técnica de Koch se revolucionó en 1887, cuando su asistente, Richard Petri descubrió un método donde utilizaba dos platos redondos, uno para medio de cultivo y otro un poco más grande para actuar como tapa. Desde entonces, aparte del desarrollo de cajas Petri y de asas desechables de plástico, las principales herramientas utilizadas por los microbiólogos para la inoculación de muestras en superficies de agar han permanecido relativamente sin cambios. Aunque en algunos laboratorios de microbiología se utilizan ampliamente sistemas de hemocultivos, sistemas automatizados de identificación microbiana y sistemas automatizados de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. ^[3] El procesamiento de inoculación y estriado de muestras microbiológicas para aislamiento de agentes infecciosos, en muchos laboratorios de diagnóstico de rutina sigue siendo una actividad manual que consume mucho tiempo y es el proceso donde ocurren mayor cantidad de errores. Se sabe que ésta etapa ocupa una parte importante de carga de trabajo, consumiendo el 25% del tiempo del personal dedicado a la recepción y procesamiento inicial de las muestras. El desarrollo de dispositivos de inoculación y separación, tales como sistemas robóticos han hecho contribuciones a la automatización reduciendo el tiempo de proceso de un 50 -70%. ^[7, 13, 15, 26]

La automatización en el laboratorio de microbiología no ha sido una tarea fácil debido a la variedad de tipo de muestras y la diversidad de microorganismos a identificar. La

identificación completa suele tardar hasta dos días o incluso más para los organismos exigentes. ^[15, 26]

El incremento en pruebas y carga de trabajo del 10 al 15% anual, una creciente escasez de personal capacitado, las demandas de control de infección y los desafíos crecientes resultantes de la detección e identificación de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, trae consigo la necesidad de implementación de nuevas tecnologías automatizadas, que contribuyan a aumentar productividad, disminuir costos, mejorar la estandarización, la reproductividad y trazabilidad, ofreciendo así un sistema más eficiente y seguro para el desarrollo de procesos en el laboratorio de microbiología trayendo consigo beneficios que serán reflejados en la salud del paciente. ^[3, 5, 26]

Hay evidencia científica creciente que demuestra que el pronóstico de un paciente crítico infectado, depende del inicio precoz con el antimicrobiano adecuado, por lo cual es fundamental que el laboratorio de microbiología sea capaz de proveer identificación microbiana confiable, así como reportes de susceptibilidad estandarizados y reproducibles. ^[15]

La automatización en microbiología tiene como objetivo agilizar la identificación del agente etiológico de una infección y determinar la susceptibilidad de diferentes antimicrobianos para obtener los mejores resultados clínicos, así mismo garantizar resultados exactos, significativos y clínicamente relevantes, que contribuya a mejorar la toma de decisiones. ^[25] Para lograr el objetivo de la automatización en microbiología es necesario optimizar la productividad y flujos de trabajo, partiendo desde el proceso de inoculación y estriado, pasando por los diferentes test de identificación y susceptibilidad hasta el post-analítico. ^[15]

Para el proceso de inoculación y estriado se han desarrollado equipos automatizados que de manera robotizada, logran sembrar muestras líquidas, sobre placas para luego ser incubadas y analizadas.

La inoculación automatizada de las diferentes muestras clínicas en la superficie de medios de cultivo que permitan el desarrollo de microorganismos ha sido un punto largamente anhelado con el fin de lograr optimizar los flujos de trabajo.

Procesadores automatizados

Existen hoy en el mercado diferentes equipos que abordan esta necesidad. Sistemas como Innova (BD Diagnostics, Sparks, MD), el procesador de muestras InoqIA de automatización completa / interacción manual (FA/MI) (BD Kiestra BV, Drachten, Holanda), Previ Isola (BioMerieux, Inc., Hazelwood, MO) y el procesador WASP (Copan Diagnostics, Murrieta, CA). Los cuales utilizan diferentes metodologías de siembra y han demostrado que son más reproducibles que la siembra manual, que permiten obtener un mayor número de colonias aisladas y además disminuyen la carga de trabajo. ^[3, 5, 8, 13, 17, 26]

En la actualidad los equipos automatizados, representan una gran ayuda para los integrantes de los laboratorios de microbiología, pero no pueden sustituir al personal entrenado, capacitado y actualizado en ésta área. Los equipos están diseñados para atender la rutina de un laboratorio microbiológico y así brindarles tiempo a las personas para realizar aquellas acciones que no están contempladas o que son insuficientes.

El costo de implementar sistemas automatizados en microbiología, es compensado con resultados certeros que tendrán repercusión directa sobre el tratamiento, estancia del paciente y sobre los costos hospitalarios que éste genere, así como sobre una oportuna recuperación. ^[28]

Procesador de muestras Kiestra InoquIA BD™

Kiestra InoquIA BD™ es un instrumento automatizado capaz de seleccionar placas de medios de cultivo, etiquetar las placas, homogenizar y destaponar los tubos con muestra por medio de sus brazos robóticos, utilizando un pipeteador de precisión con puntas desechables inocula volúmenes definidos de muestra, para su posterior siembra la cual tiene capacidad de hasta 5 placas a la vez, utilizando perlas magnéticas para la dispersión de muestra, al término del ciclo de dispersión las placas se ordenan y se dirigen a apiladores de salida especificados según el tipo de incubación programada para ser retiradas por el operador. Kiestra InoquIA BD™ de automatización completa / interacción manual (FA/MI) (BD Kiestra BV, Drachten, Holanda)

Figura 1, intenta resolver problemas de calidad y estandarización de la estría e inóculo, además de evitar contaminación cruzada implementando pipetas desechables para inocular en placa, reduce tiempo de procesamiento y costos. Al lograr un cultivo con colonias bien aisladas, reduciendo la necesidad de hacer subcultivos, con el consiguiente ahorro en tiempo y reactivos. [3, 5, 15, 26].

Figura 1. Kiestra InoquIA BD™



III.- JUSTIFICACIÓN

Es necesario estandarizar el proceso de inoculación y estriado ya que es uno de los principales procesos para la recuperación de agentes infecciosos en muestras de orina, de éste depende el desarrollo del cultivo importante para los siguientes procesos de identificación y susceptibilidad, al estandarizarlo garantiza un manejo adecuado de la muestra, obteniendo resultados oportunos y confiables favoreciendo directamente la salud del paciente, el control de infecciones, tratamiento, duración de hospitalización y sus costos, así como también mejora el rendimiento del personal del laboratorio y reducción de riesgos laborales.

El Instituto Nacional de Cancerología, es el segundo laboratorio mexicano en implementar Kiestra InoqulA BD™ como sistema automático de inoculación y estriado en el área de microbiología clínica, por lo cual no existe una evaluación de éste en siembra de orina y la concordancia con la siembra manual basada en métodos convencionales con recuento semicuantitativo de colonias.

IV.- HIPÓTESIS

La implementación de un método automatizado para siembra de orina en el laboratorio de microbiología estandarizará el proceso de inoculación y estriado para mejorar la reproducibilidad y la recuperación de colonias aisladas, lo cual agilizará el proceso de identificación de agentes infecciosos causantes de infecciones en vías urinarias y facilitará la lectura e interpretación de manera semicuantitativa.

V.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar un sistema automatizado de siembra en muestras de orina y su concordancia con la siembra manual basada en el recuento semicuantitativo de colonias.

VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la siembra automatizada empleando Kiestra Inoqula BD™ vs. método convencional con recuento semicuantitativo de colonias en urocultivo.
- 2.- Seleccionar el tipo de patrón de estría adecuado para muestras de orina.
- 3.- Trazar un patrón semicuantitativo que facilite la identificación entre urocultivos positivos y negativos.

VII.- MATERIALES Y MÉTODOS

El equipo Kiestra Inoqula BD™ se evaluó en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de manera automatizada para siembra de muestras de orina, se utilizaron medios de cultivo en placa del fabricante Becton Dickinson (BD), cepas bacterianas estándar y muestras clínicas humanas. Se realizó la siembra pareada por ambos métodos MC vs. Kiestra Inoqula BD™ para su evaluación, dejando incubar durante 24 horas.

El desarrollo de este trabajo constó de tres fases.

Fase 1. Selección de patrón de dispersión.

El sistema automatizado Kiestra Inoqula BD™ ofrece 6 diferentes opciones de programación para dispersión de la muestra sobre placa con agar, dicho patrón tiene la finalidad de diseminar la muestra en la superficie del medio de cultivo.

Se ocuparon cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 28922 (Sol. 1) y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Sol. 2), se utilizaron colonias de cada especie bacteriana para preparar una suspensión bacteriana en tubo con solución salina estéril (ID BD 4.5 mL) ajustada a una turbidez de 0.5 Mc Farland medida en un nefelómetro (PhoenixSpec BD) y correspondiente a

una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL ^[20] de la suspensión monomicrobiana de Sol. 1 y en combinación Sol. 1 + Sol. 2 (Mezcla 1) se prepararon diferentes concentraciones de las suspensiones en solución salina que oscilaban entre 1.5×10^4 - 1.5×10^8 UFC/mL, haciendo diluciones en serie de 10 veces en solución salina. Se tomaron las soluciones 1.5×10^8 (Tubo 1), 1.5×10^5 (Tubo 2) y 1.5×10^4 (Tubo 3) *Figura 2*. Los 3 tubos de Sol. 1 y Mezcla 1 fueron sembrados de forma automatizada con el equipo Kiestra InoqulA BD TM programando cada uno de los 6 patrones de dispersión (Anexo3) recomendados por el fabricante, se utilizaron en ambos casos medios de cultivo enriquecidos agar con 5% sangre de carnero, como agar orientador y solo en el caso de Sol. 1 se sembró también en agar Mac Conkey (Anexo 4), incubando en un periodo de 24h a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en estufa bacteriológica (Marca RIOS-ROCHA Mod EC102), se observó el desarrollo microbiano y mediante una matriz de decisiones se calificaron los patrones de dispersión para muestras de orina *Figura 3*, donde se consideró; patrón visual vs. concentración (facilidad de distinguir la relación entre ambas) con una ponderación de 35%, capacidad de aislamiento con 30%, separación entre estrías (características de estriado) 20% y tiempo de estriado 15%. Con base en los resultados de la matriz de decisiones se seleccionó el patrón de dispersión para trabajar con muestras de orina.

Figura 2. Diluciones seriadas de *Escherichia coli* (Sol. 1) y *Escherichia coli* + *Staphylococcus aureus* (Mezcla 1)

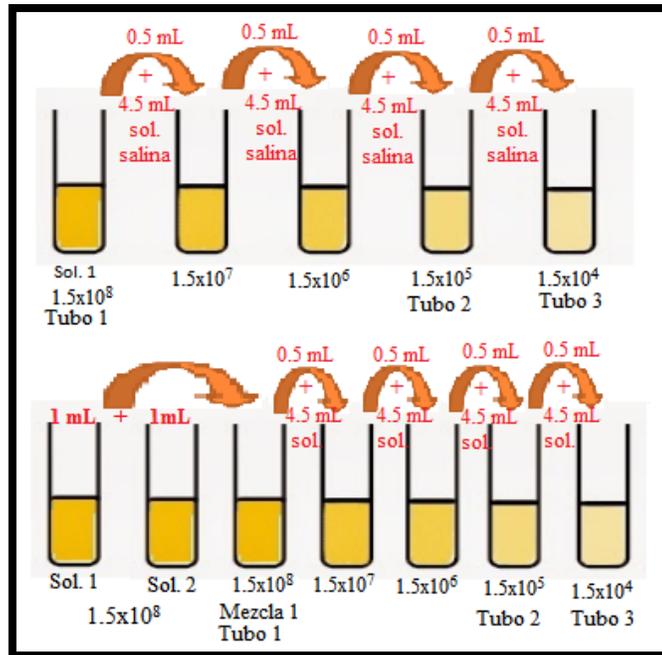


Figura 3. Matriz de decisiones utilizada para elegir patrón de dispersión.

Factor	Ponderación	Patrón ""#""	
	%	Calificación	Total
Patrón visual vs. concentración	35	7	2.45
Aislamiento de colonias	30	8	2.4
Separación entre estrías	20	8	1.6
Tiempo de estriado	15	8	1.2
Total:	100		7.65

En ésta figura se muestra un ejemplo de cómo se aplicó la matriz de decisiones para cada caso en los diferentes tipos de medios de cultivo utilizados.

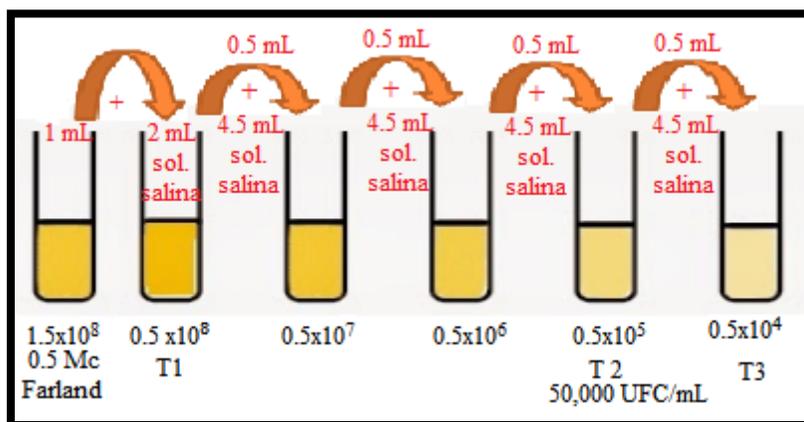
Fase 2. Zonas de desarrollo microbiano en caja Petri que facilitará la lectura de urocultivos positivos de manera semicuantitativa.

De acuerdo a las pautas específicas para los urocultivos es necesaria la detección de >50,000 UFC/mL para identificar urocultivos positivos, por lo cual se indica utilizar asas calibradas para inocular, el equipo Kiestra Inoqula BD™ inocular 10 µL de muestra como mínimo por lo tanto cada colonia presente representa 100 UFC/mL esto correspondería a realizar un conteo de 500 colonias para detección de urocultivos positivos esto resultaría una tarea difícil y prácticamente imposible a la vista humana, por lo tanto se buscó una plantilla cualitativa que represente cantidades de detección positiva las cuales facilitaron la tarea de lectura e interpretación de urocultivos.

Se utilizaron cepas de control *Escherichia coli* ATCC 28922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700803 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 las cuales se llevaron a una concentración estándar de 0.5 escala Mac Farland correspondiente a 1.5×10^8 UFC/mL utilizando solución salina estéril (ID BD 4.5 mL) y nefelómetro (PhoenixSpec BD), posteriormente se realizó un dilución 1:3 equivalente a 0.5×10^8 UFC/mL (T1) de manera individual, a partir de la primer concentración estándar se realizaron diluciones en serie que oscilaban de 0.5×10^4 - 0.5×10^8 UFC/mL de cada uno de los microorganismos *Figura 4*. Los microorganismos en concentraciones T1, 0.5×10^5 (T2) y 0.5×10^4 UFC/mL (T3) fueron sembrados por triplicado de forma automatizada con el equipo Kiestra Inoqula BD™ programado con el patrón de dispersión seleccionado en la Fase 1, se utilizaron en todos los casos medios de cultivo enriquecidos agar con 5% sangre de carnero(A), cromo agar orientador (B) y se sembró también en agar Mac Conkey (C) para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, incubando en

un periodo de 24h a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en estufa bacteriológica (Marca RIOS-ROCHA Mod EC102), se observó el desarrollo microbiano en cada concentración particularmente en T2 equivalente a $>50,000$ UFC/mL, en todos los microorganismos, con particular atención a la distribución en las diferentes zonas de la placa y de forma cualitativa se trazaron 9 zonas diferentes en toda la caja donde se identificó un patrón cualitativo de desarrollo según la concentración estándar de los microorganismos.

Figura 4. Diluciones con sepas puras ATCC para elaboración de platilla para cuenta semicuantitativa.



Fase 3. Evaluación de siembra en muestras de orina.

Se realizó un estudio prospectivo calculando la “n” muestral a partir de una población de 700 pacientes, los cuales corresponden al promedio de los pacientes ambulatorios y hospitalizados mensualmente en el INCan donde se obtuvo una $n= 248$ pacientes calculada con un nivel de confianza del 95% (Anexo7). Se recolectaron las muestras de orina al azar, provenientes de pacientes internos y externos del INCan, la muestra fue recolectada en un frasco estéril y transportada en tubo de tapón gris (C&S BD™) con ácido bórico como conservador. Diariamente se realizó la siembra de orinas según protocolo MC con asa calibrada de $1\mu\text{L}$ y

10 μ L (Anexo 1) en placa de agar con 5% sangre de carnero y Mac Conkey, en paralelo se sembró en método automatizado con Kiestra Inoqula BD TM el cual mediante un software selecciona las placas (mismas que el MC), las etiqueta e inocular 10 μ L de muestra con ayuda de una pipeta estéril y dispersa la muestra con una perla magnética la cual sigue el patrón seleccionado en Fase 1, las muestras fueron incubadas a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24h y posteriormente evaluadas de forma semicuantitativa según los criterios establecidos para MC y siguiendo las características encontradas en Fase 2 para las muestras sembradas de forma automatizada en el equipo Kiestra Inoqula BD TM definiendo entre urocultivos positivos y negativos.

Correlación entre métodos MC vs. Kiestra Inoqula BD TM

Se realizó el análisis estadístico de urocultivos positivos y negativos tras la inoculación manual MC con 1 μ L, 10 μ L y automatizada Kiestra Inoqula BD TM: los datos obtenidos fueron analizados usando el estadístico de prueba Kappa de Cohen en el programa SPSS statistics 18 para analizar la correlación entre ambos métodos y evaluar si el equipo Kiestra Inoqula BD TM es una herramienta que pueda suplir la siembra manual de MC utilizado en siembra de muestras de orina.

Evaluación de aislamiento

Se realizó un conteo de colonias definidas para cada uno de los casos positivos calificando como: bueno ≥ 10 , regular de 5-9 y malo < 5 , respectivamente. Se compararon entre MC y el sistema automatizado Kiestra Inoqula BDTM utilizados, para evaluar la capacidad de aislamiento mediante cálculos de porcentajes.

Evaluación de contaminación cruzada

Se compararon los resultados positivos y negativos entre MC vs. Kiestra Inoqula BD™, en caso de los resultados positivos se utilizaron métodos de identificación para determinar si existía evidencia de cualquier contaminación cruzada entre especímenes entre las muestras por ambos métodos. La identificación de microorganismos en urocultivos positivos sembrados en sistema automatizado se realizó con MALDI TOF una prueba directa de una colonia (Anexo 5) y en placas sembradas con MC se realizó con Phoenix™ 100 BD (Anexo 6) se compararon los resultados de identificación entre ambos métodos.

Evaluación de tiempo empleado para siembra entre método MC vs. Kiestra Inoqula BD™

Se mide el tiempo de inoculación utilizando 20 de las muestras analizadas en este trabajo, midiendo el tiempo de inoculación y estriado con MC vs. Kiestra Inoqula BD™, en MC se utiliza un asa Nichrome de 1µL, llevando a cabo el procedimiento como es indicado en (Anexo 1), se tomó el tiempo a partir del rotulado de placas necesarias para urocultivo, en sistema automatizado Kiestra Inoqula BD™ a partir del encendido del equipo, esta prueba fue realizada por el mismo personal en ambos métodos el cual está capacitado, se anotaron los tiempos en minutos, se hace un cálculo de porcentajes de tiempo del personal invertido en la siembra de las 20 muestras en ambos métodos comparando los resultados entre ambos.

VIII.- RESULTADOS

Fase 1.- Selección de patrón de dispersión.

En cuanto a la selección del patrón de dispersión, los resultados preliminares que se realizaron para comparar entre los 6 patrones experimentados, se realizó mediante una matriz de decisiones en donde se consideraron: Patrón visual vs. concentración la cual se consideró como la facilidad de distinguir entre concentración y el crecimiento alcanzado en toda la placa buscando un patrón visual que facilitara la relación entre ambas a esta característica se le asignó una ponderación de 35%; capacidad de aislamiento, definida para este trabajo como la capacidad de generar colonias aisladas en mayor cantidad en las diferentes concentraciones dándole un valor de 30%; separación entre estrías en este punto se consideraron de forma general las características físicas del patrón con un valor de 20% y por último tiempo de estriado el cual está establecido por el fabricante con un valor de 15%, el cual se mantiene fijo en todos los casos. Cada uno de los 4 puntos a evaluar se calificó del 1 al 10 según sus características visuales siendo 10 la máxima calificación.

Se evaluaron las tres concentraciones (Tubo 1, 2 y 3) de Sol. 1 y Mezcla 1 de forma individual entre los diferentes medios de cultivo y patrones de dispersión utilizados, para después sacar un promedio de las calificaciones obtenidas como se muestra en la *Tabla 1* y *2*, posteriormente obtener un resultado final.

Tabla 1. Promedio de calificaciones obtenidas en Tubo 1, 2 y 3 en los tres diferentes medios de cultivo utilizados en Sol. 1.

Cromo agar orientador, Agar sangre, Agar Mac Conkey							
Promedio de Tubo 1, 2 y 3 *				Sol. 1			
Factor	Ponderación	Patrón 4		Patrón 5		Patrón 7	
	%	Calificación	Total	Calificación	Total	Calificación	Total
Patrón visual vs. concentración	35	6.6	2.3	7.1	2.5	7.0	2.5
Aislamiento de colonias	30	6.7	2	7.3	2.2	7.2	2.2
Separación entre estrías	20	6.7	1.3	7.3	1.5	7.1	1.4
Tiempo de estriado	15	8.0	1.2	10.0	1.5	10.0	1.5
Total:	100		6.8		7.7		7.5

Cromo agar orientador, Agar sangre, Agar Mac Conkey							
Promedio de Tubo 1, 2 y 3 *				Sol. 1			
Factor	Ponderación	Patrón 9		Patrón 10		Patrón 11	
	%	Calificación	Total	Calificación	Total	Calificación	Total
Patrón visual vs. concentración	35	9.7	3.4	7.0	2.5	6.4	2.3
Aislamiento de colonias	30	8.8	2.6	6.9	2.1	6.8	2.0
Separación entre estrías	20	9.7	1.9	6.5	1.3	6.4	1.3
Tiempo de estriado	15	7.0	1.1	9.0	1.4	7.0	1.05
Total:	100		9.0		7.2		6.6

*Tubo 1 = 1.5×10^8 UFC/mL, Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL, Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL, de Sol. 1 (*Escherichia coli*)

Tabla 2. Promedio de calificaciones obtenidas en Tubo 1, 2 y 3 en los dos medios de cultivo utilizados en Mezcla 1

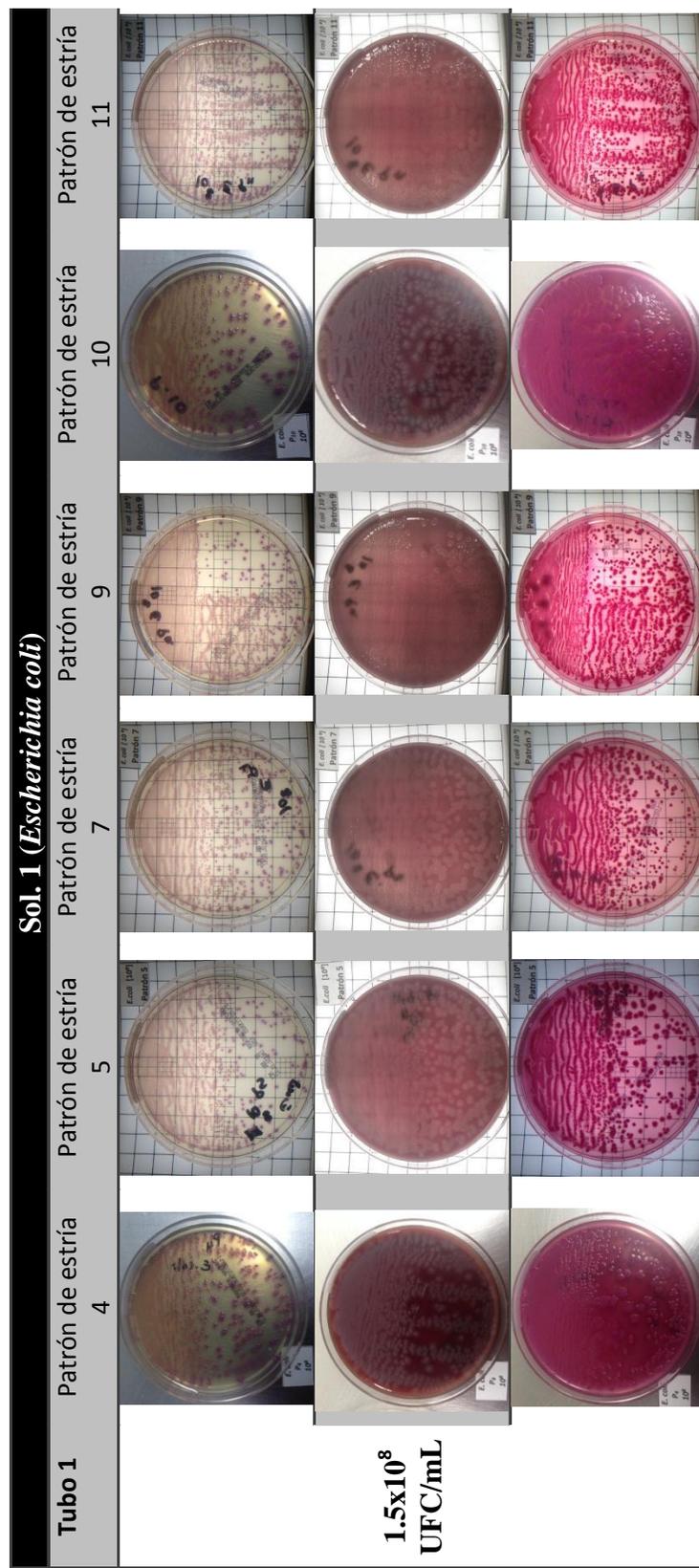
Cromo agar orientador, Agar sangre							
Promedio de Tubo 1, 2 y 3 * Mezcla 1							
Factor	Ponderación	Patrón 4		Patrón 5		Patrón 7	
	%	Calificación	Total	Calificación	Total	Calificación	Total
Patrón visual vs. concentración	35	7.3	2.6	7.3	2.6	7.2	2.5
Aislamiento de colonias	30	7.3	2.2	7.2	2.2	7.3	2.2
Separación entre estrías	20	7.0	1.4	7.2	1.4	7.3	1.5
Tiempo de estriado	15	8.0	1.2	10.0	1.5	10.0	1.5
Total:	100		7.4		7.7		7.7

Cromo agar orientador, Agar sangre							
Promedio de Tubo 1, 2 y 3 * Mezcla 1							
Factor	Ponderación	Patrón 9		Patrón 10		Patrón 11	
	%	Calificación	Total	Calificación	Total	Calificación	Total
Patrón visual vs. concentración	35	9.7	3.4	7.3	2.6	6.7	2.3
Aislamiento de colonias	30	8.7	2.6	7.3	2.2	6.2	1.9
Separación entre estrías	20	9.5	1.9	7.0	1.4	6.5	1.3
Tiempo de estriado	15	7.0	1.1	9.0	1.4	7.0	1.05
Total:	100		8.9		7.5		6.5

*Tubo 1 = 1.5×10^8 UFC/mL, Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL, Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL, de Mezcla 1 (*Escherichia coli* + *Staphylococcus aureus*)

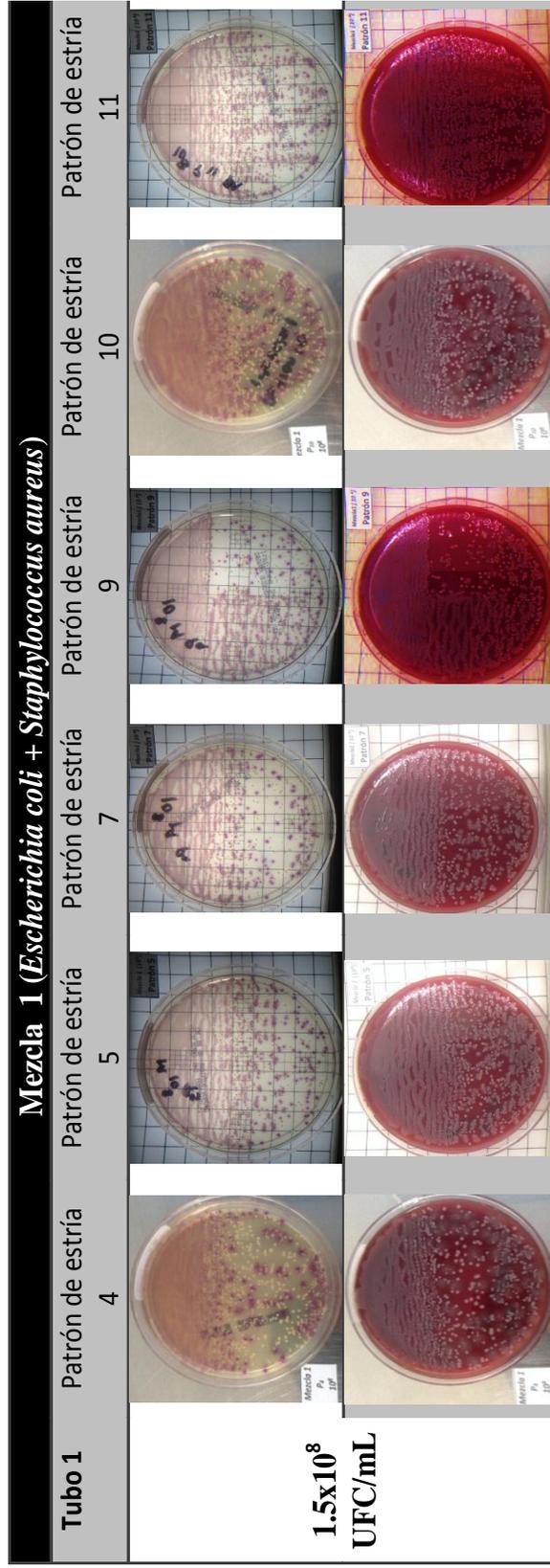
Para la mayor concentración “Tubo 1” en ambos casos Sol. 1 y Mezcla 1, se encontró que la relación de Patrón visual vs. concentración en los diferentes medios de cultivo hubo desarrollo microbiano abundante que ocupó todas las zonas de la caja, sin embargo, la capacidad de aislamiento fue casi nula en caso de patrón 11 y de forma contraria en el patrón 4 y 9, donde se tiene mejor recuperación de colonias aisladas, en cuanto a las características generales de cada patrón de dispersión las diferencias entre patrón 4, 5, 7 y 10 son mínimas, pero en el caso del patrón 11 se observaron estrías muy pegadas lo cual lo coloca con la calificación más baja en este punto a evaluado. Estas características se muestran en la *Figura 5 y 6*.

Figura 5. Características generales de la siembra de concentración alta (Tubo 1) en los 6 diferentes patrones de dispersión disponibles para muestra de orina con Sol. 1 (*Escherichia coli*)



Se observan las características de dispersión entre los 6 patrones recomendados para muestras de orina, utilizando una concentración de Tubo 1 = 1.5×10^8 UFC/mL de cepa ATCC 28922 *Escherichia coli*, sembrado en cromagar orientador, agar sangre y agar Mac Conkey.

Figura 6. Características generales de la siembra de concentración alta de dos microorganismos (Tubo 1) en los 6 diferentes patrones de dispersión disponibles para muestra 1 (*Escherichia coli* + *Staphylococcus aureus*)

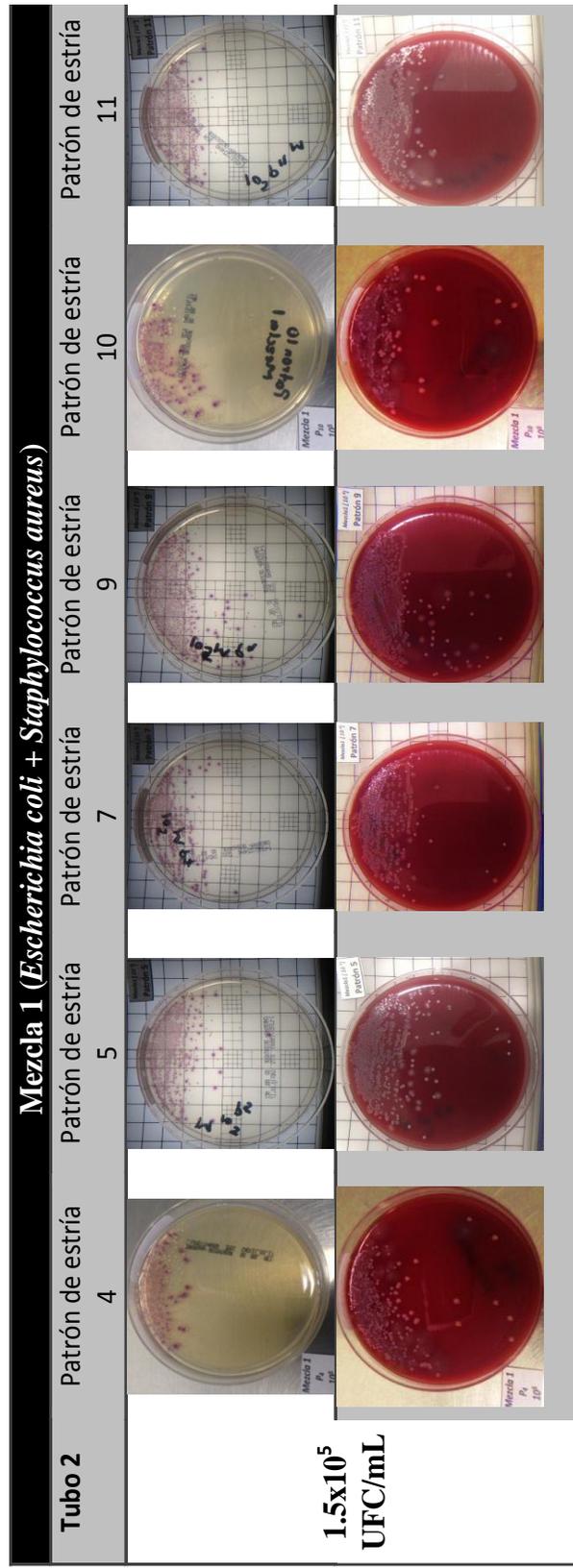


Se muestran las características encontradas cuando se presenta una mezcla de dos microorganismos en concentraciones de Tubo 1=1.5x10⁸ UFC/mL de cepas de control ATCC 28922 *Escherichia coli* + ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*, sembradas en cromogágar orientador y agar sangre.

En el caso de la concentración de Tubo 2 correspondiente a 1.5×10^5 UFC/mL, el patrón visual vs. concentración se obtuvo una diferencia mínima entre los diferentes patrones excepto en el patrón dispersión 9 donde se observa de forma cualitativa y definida que el desarrollo no llega al tercer tercio de la placa siguiendo el patrón de dispersión, con respecto al aislamiento de colonias también tiene mejor recuperación el patrón de dispersión 9 y para el patrón de dispersión 11 el aislamiento es nulo y escaso en los patrones de dispersión restantes, en características generales de los patrones es difícil encontrar diferencias ya que todos inician con patrones similares pero se encuentran mejor distribuidas en el patrón de dispersión 9. Lo cual podemos observar en las *Figuras 7 y 8*.

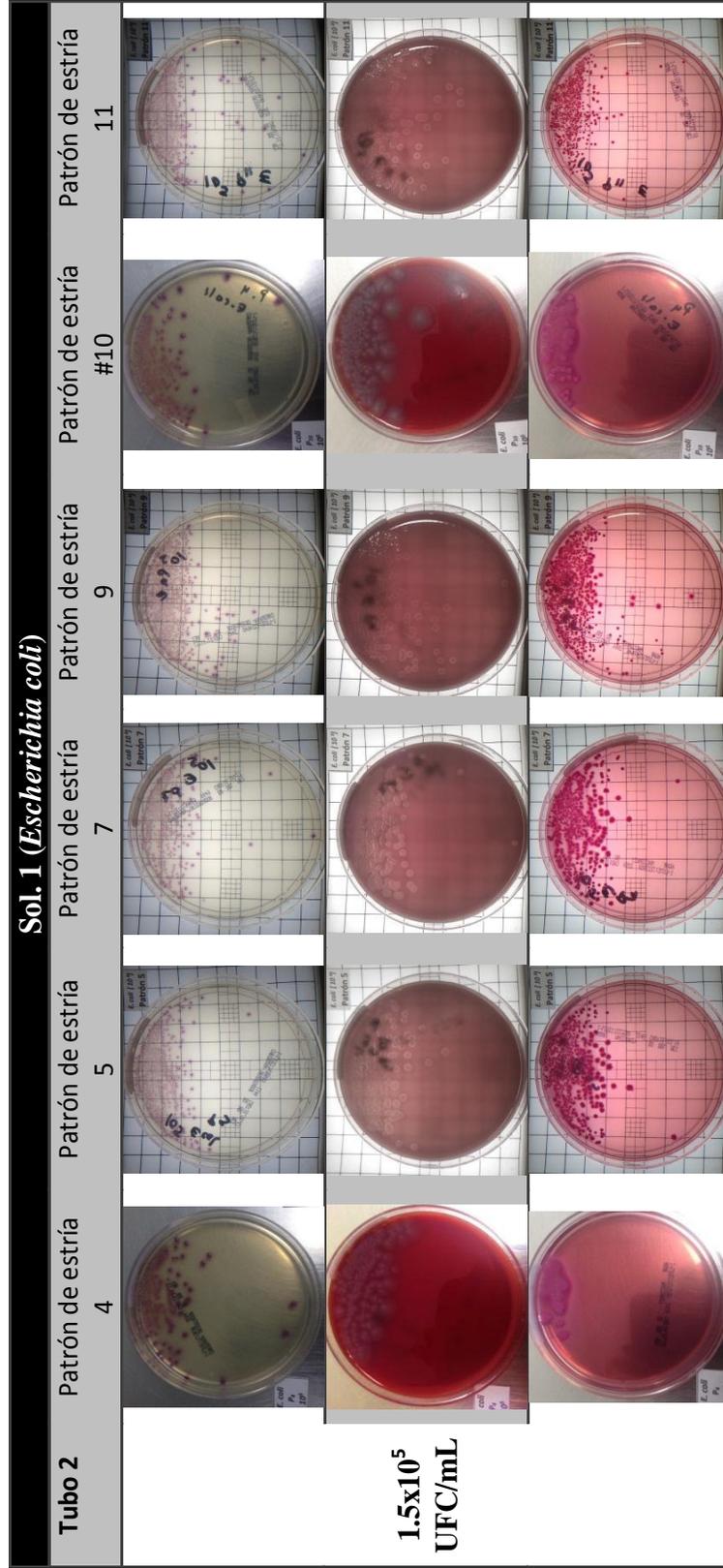
En la concentración baja Tubo 3 de ambas suspensiones bacterianas el patrón visual vs. concentración, el patrón 4 y 10 tienen baja recuperación de microorganismos y el resto de los patrones presentan una relación mínima, sin embargo en aislamiento son mejores los patrones 5 y 9, en características físicas generales son similares excepto en patrones 4 y 10 donde se ve una diferencia marcada y obtienen baja calificación en esta concentración. Como se observa en las *Figuras 9 y 10*.

Figura 7. Características generales de la siembra de concentración correspondiente a Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL de mezcla de dos microorganismos en los 6 diferentes patrones de dispersión disponibles para muestra de orina con Mezcla 1 (*Escherichia coli* + *Staphylococcus aureus*).



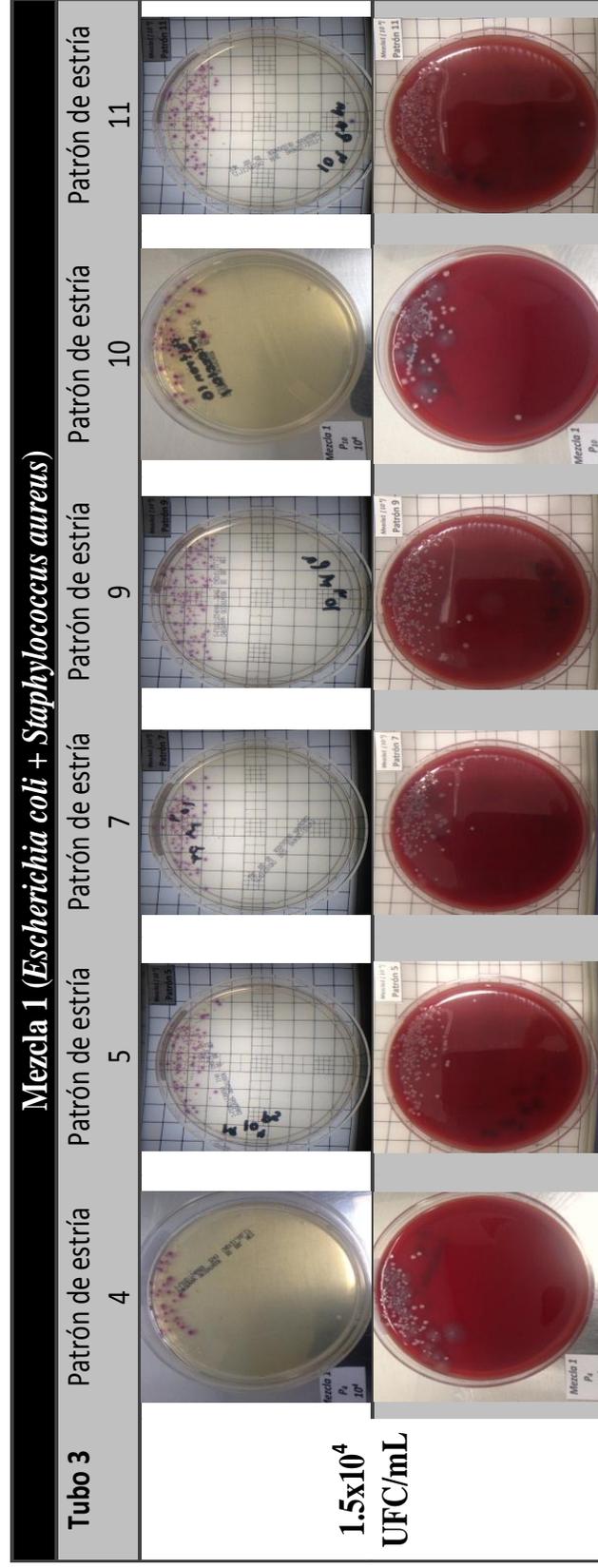
Se observan las características encontradas cuando se presenta una mezcla de dos microorganismos en concentraciones de Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL de cepas de control ATCC 28922 *Escherichia coli* + ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*, sembradas en cromóagar orientador y agar sangre.

Figura 8. Características generales de la siembra de concentración correspondiente a Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL de un microorganismo en los 6 diferentes patrones de dispersión disponibles para muestra de orina con Sol. 1 (*Escherichia coli*)



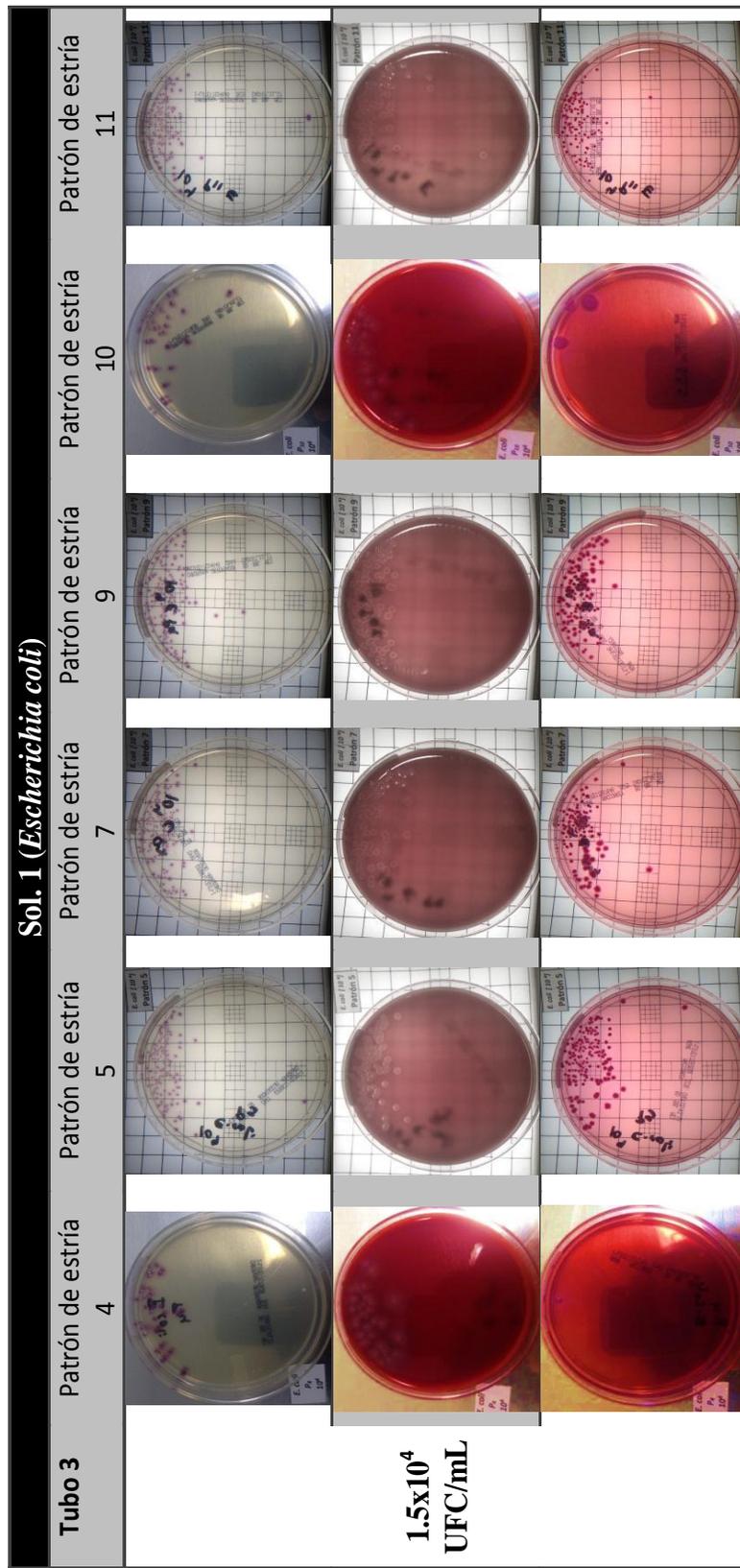
Se muestran las características generales encontradas en la siembra de concentración de Tubo 2 = 1.5×10^5 UFC/mL de cepa de control ATCC 28922 *Escherichia coli*, sembrado en cromoagar orientador, agar sangre y agar Mac Conkey.

Figura 9. Características generales de la siembra en concentraciones bajas Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL sembradas en los 6 patrones de dispersión disponibles para muestra de orina con mezcla de dos microorganismos Mezcla 1



Se pueden observar las características encontradas cuando se presenta una mezcla de dos microorganismos en concentraciones de Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL de cepas de control ATCC 28922 *Escherichia coli* + ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*, sembradas en cromóagar orientador y agar sangre.

Figura 10. Características generales de la siembra en concentraciones bajas Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL sembradas en los 6 patrones de dispersión disponibles para muestra de orina con un microorganismo Sol. 1.



Se observan las características de desarrollo de cada patrón de la siembra de concentración de Tubo 3 = 1.5×10^4 UFC/mL de cepa de control ATCC 28922 *Escherichia coli*, sembrado en cromogag orientador, agar sangre y agar Mac Conkey.

La obtención de resultados de cada matriz de decisiones se consideró cada una de las calificaciones obtenidas de manera individual en los diferentes medios de cultivo en ambas suspensiones bacterianas y en diferentes concentraciones, para sacar el promedio general y llegar a un resultado final. Como se observa en *Tabla 3*. Llegando a un resultado final donde es claro que el patrón de dispersión 9 obtuvo la mayor calificación posicionándolo como el mejor patrón de dispersión.

Tabla 3. Calificación final para elegir patrón de dispersión.

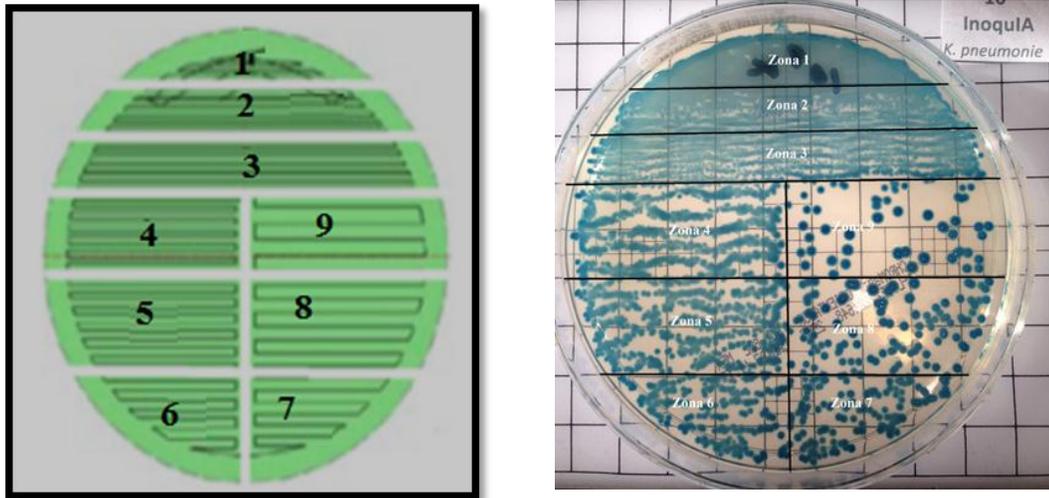
Resultados finales			
Patrón	Calificación Solución 1	Calificación Mezcla 1	Promedio
No.4	6.8	7.4	7.1
No.5	7.7	7.7	7.7
No.7	7.5	7.7	7.6
No.9	9.0	8.9	9.0
No.10	7.2	7.5	7.3
No.11	6.6	6.5	6.6

Muestra el promedio general de las calificaciones finales provenientes de la matriz de decisiones utilizada para la elección del patrón de dispersión que cumpla con las necesidades requeridas para siembra de orina.

Fase 2.- Zonas de desarrollo microbiano en caja Petri.

Los tres microorganismos con los que se trabajó los cuales se encontraban en diferentes concentraciones que oscilaban entre 0.5×10^4 - 0.5×10^8 UFC/mL (T1, T2, T3) se sembraron por triplicado utilizando agar con 5% sangre de carnero(A), cromo agar orientador (B) y se sembró también en agar Mac Conkey (C) para *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumonie*, en equipo automatizado Kiestra InoqulA BD™ con el patrón de dispersión 9 que fue el que en resultados anteriores se posiciono como el adecuado para trabajar muestras de orina. Se dividió la caja Petri de manera proporcional y siguiendo el patrón de dispersión en 9 zonas de desarrollo. Como se muestra en la *Figura 11*.

Figura 11. Patrón de dispersión 9 dividido en 9 zonas de desarrollo.



Representa el recorrido de la perla magnética en la caja Petri, correspondiente al patrón de dispersión 9 la cual fue dividida en 9 zonas de desarrollo para facilitar la interpretación semicuantitativa.

De forma individual se observó el desarrollo bacteriano de los tres microorganismos en las diferentes concentraciones y medios utilizados, obteniendo un patrón de desarrollo cualitativo, el cual fue proporcional a las diferentes concentraciones y demostraron reproducibilidad sin mostrar diferencias significativas entre los medios donde fueron inoculados. Los resultados se pueden observar en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Resultados de la reproducibilidad de Kiestra Inoqula BD™ en los diferentes medios utilizados y los diferentes microorganismos utilizados.

Microorganismo	Concentración	Agar	Zona de desarrollo	Sembrado 1	Sembrado 2	Sembrado 3	Reproducibilidad
<i>Escherichia coli</i>	T1	A, B, C	Todas	✓	✓	✓	Si
	T2	A, B, C	Zona 3-4	✓	✓	✓	Si
	T3	A, B, C	Zona 2	✓	✓	✓	Si
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	T1	A, B, C	Todas	✓	✓	✓	Si
	T2	A, B, C	Zona 3-4	✓	✓	✓	Si
	T3	A, B, C	Zona 2	✓	✓	✓	Si
<i>Enterococcus faecalis</i>	T1	A y B	Todas	✓	✓	✓	Si
	T2	A y B	Zona 3-4	✓	✓	✓	Si
	T3	A y B	Zona 2	✓	✓	✓	Si

Contiene los resultados de la siembra por triplicado de cada microorganismo donde T1=0.5x10⁸ UFC/mL, T2=0.5x10⁵ UFC/mL, T3=0.5x10⁴ UFC/mL y A=agar sangre, B=Cromo agar Orientador y C= agar Mac Conkey.

En concentraciones altas (T1) se obtuvo un desarrollo en toda la caja que incluía las 9 zonas como se observa en la *Figura 12*. En caso de concentraciones que son decisivas para un conteo correspondiente a un urocultivo positivo es decir (T2) equivalente a 50,000 UFC/mL se encontró un patrón de desarrollo que se encuentra entre zona 3-4 donde se observaron colonias aisladas y en zona 1 y 2 con desarrollo bacteriano incontable en esta concentración, como se muestra en la *Figura 13*. Mientras que en concentraciones bajas (T3) el desarrollo fue escaso y solo cubría la zona 1 y 2 con colonias aisladas, se puede observar en la *Figura 14*.

Figura 22. Desarrollo bacteriano utilizando Cepas ATCC en concentraciones mayores a 100,000 UFC/mL(T1).

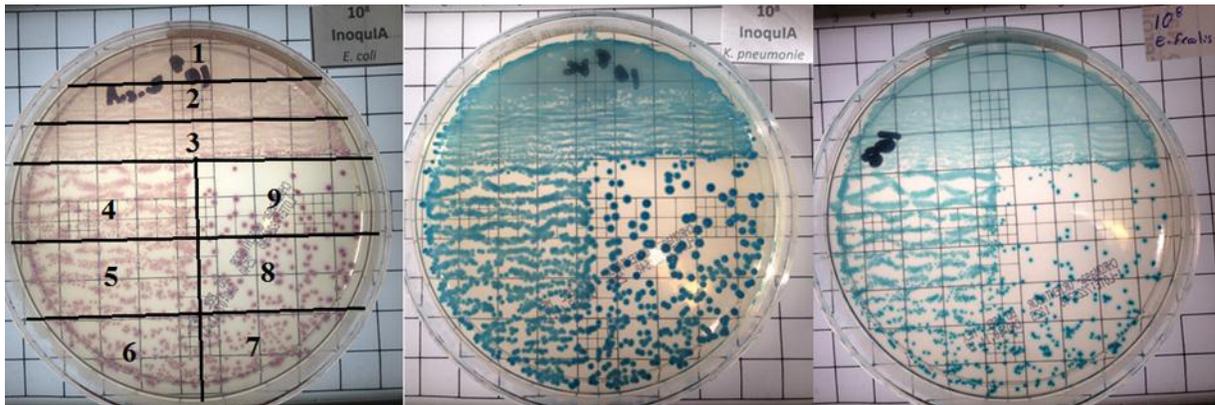


Figura 33. Desarrollo bacteriano utilizando cepas ATCC en concentraciones de 50,000UFC/mL. (T2) (Punto de corte para urocultivos positivos)

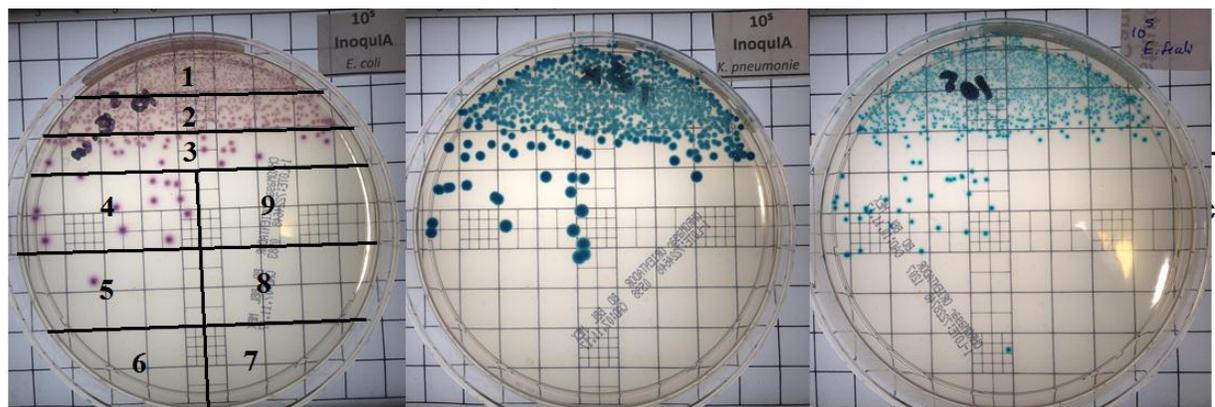
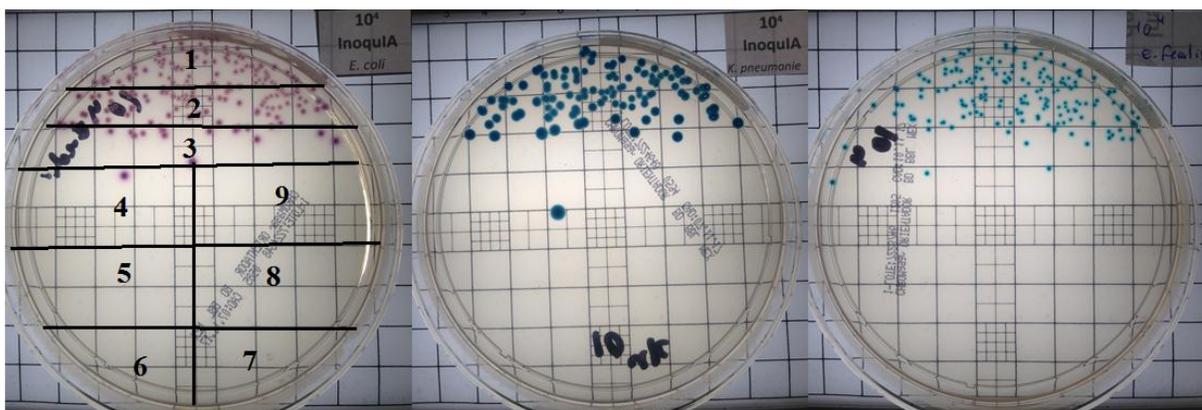


Figura 14. Desarrollo bacteriano utilizando cepas ATCC en concentraciones menores a 50,000 UFC/mL (T3)



Se muestra el desarrollo bacteriano en Cromoagar orientador de cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*, Figura 12. Concentración >100,000 UFC/mL, Figura 13 Punto de corte de urocultivos positivos con equivalente a 50,000 UFC/mL lo cual muestra un patrón de dispersión característico entre zona 3-4 para urocultivos positivos y Figura 14 con menores a punto de corte.

Fase 3.- Evaluación de siembra en muestras de orina

Correlación entre MC y Kiestra Inoqula BD™

Se recolectaron 248 muestras de orina las cuales, 239 se recolectaron por la técnica de chorro medio, 6 de sonda y 3 de nefrostomía provenientes de pacientes internos y de consulta externa, fueron sembradas de MC en paralelo con MC 10 µL y automatizada con patrón de dispersión 9 programado en Kiestra Inoqula BD™ e interpretadas con los criterios de aceptación de método semicuantitativo para MC de 1 y 10 µL y la platilla generada con en Fase 2 de este trabajo donde se considera desarrollo entre zona 3 y 4 como mínimo para la muestras sembradas con Kiestra Inoqula BD™.

Después de ser incubadas las muestras a una temperatura de 35±2°C durante 24 h fueron evaluadas de forma semicuantitativa según los criterios establecidos para MC y semicuantitativa siguiendo el patrón de desarrollo por zonas para discernir entre cultivos positivos (P) y negativos (N), obteniendo para MC 1 µL P = 60 y N = 188, MC 10 µL P = 61 y

N = 187 finalmente para Kiestra InoquLA BD™ P = 61 y N = 187. Se analizaron los datos utilizando prueba Kappa de Cohen en el programa SPSS statistics 18 para correlación entre ambos métodos.

En el análisis de prueba Kapa Cohen se tiene como resultado una correlación entre Kiestra InoquLA BD™ y MC 1 µL de 0.989 y Kiestra InoquLA BD™ MC 10 µL de 1 según la valoración del coeficiente Kappa (Anexo 8) las correlaciones tienen una fuerza de concordancia casi perfecta *Tabla 5*.

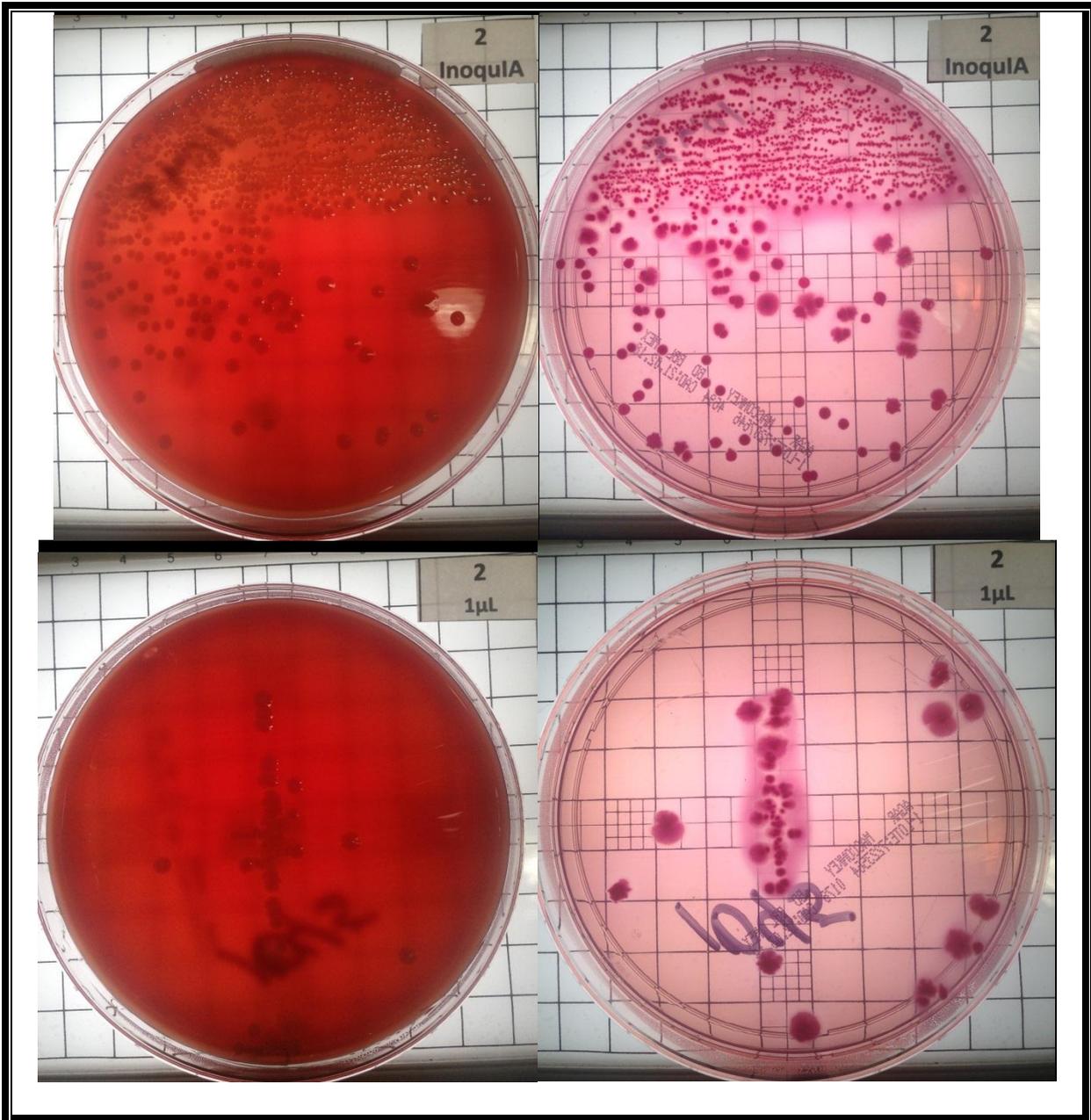
Tabla 3. Tabla de resultados de concordancia entre métodos

Tipo de siembra	Positivo	Negativo	Discordancia	Medida de acuerdo Kappa	Concordancia
Kiestra InoquLA vs. MC 1µL	60	188	1	0.989	Casi perfecta
Kiestra InoquLA vs. MC 10µL	61	187	0	1	Casi perfecta

Muestra los resultados de concordancia de resultados entre los dos métodos MC vs. Kiestra InoquLA BD™ mostrando una concordancia casi perfecta con una concordancia de 0.989, lo cual nos indica que el método automatizado coincide en un nivel aceptable con el MC.

Se obtuvo un caso discordante que presento negatividad en MC 1 µL y positividad en MC 10µL y Kiestra InoquLA BD™ *Figura 15*, el cual fue analizado de forma única e individual con sedimento urinario que presentaba leucocitos incontables, nitritos positivos, y bacterias escasas.

Figura 15. Caso de discordancia entre Kiestra Inoqula BD™ resultado positivo vs. MC 1μL resultado negativo.



Se muestra el caso discordante entre ambos métodos sembrados en agar con 5% de sangre de carnero y agar Mac Conkey en donde se muestra con MC 1 μ L una cuenta insuficiente para ser considerado un urocultivo positivo según los criterios establecidos y en la siembra con Kiestra Inoqula BD™ aplicando el uso de platilla para cuenta semicuantitativa con desarrollo presente a más de zona 3 – 4 donde se considera positivo.

Capacidad de aislamiento MC vs. Kiestra Inoqula BD™

Según la evaluación de capacidad de aislamiento encontrada en el equipo Kiestra Inoqula BD™ tiene una mejor recuperación de colonias con 82% de los casos positivos con recuperación de colonias suficientes para realizar pruebas de identificación y antibiograma, el proceso realizado en el laboratorio de microbiología del INCan se realiza con una colonia para identificación utilizando identificación rápida MALDI TOF y de 5 - 10 colonias aproximadamente para susceptibilidad esto es variable según el tamaño y morfología usando el equipo , en caso de MC con 1 y 10 µL solo se recupera alrededor del 40% con colonias suficientes para seguir los procesos de identificación y susceptibilidad como se muestra en la *Tabla 7*.

Tabla 4. Capacidad de aislamiento

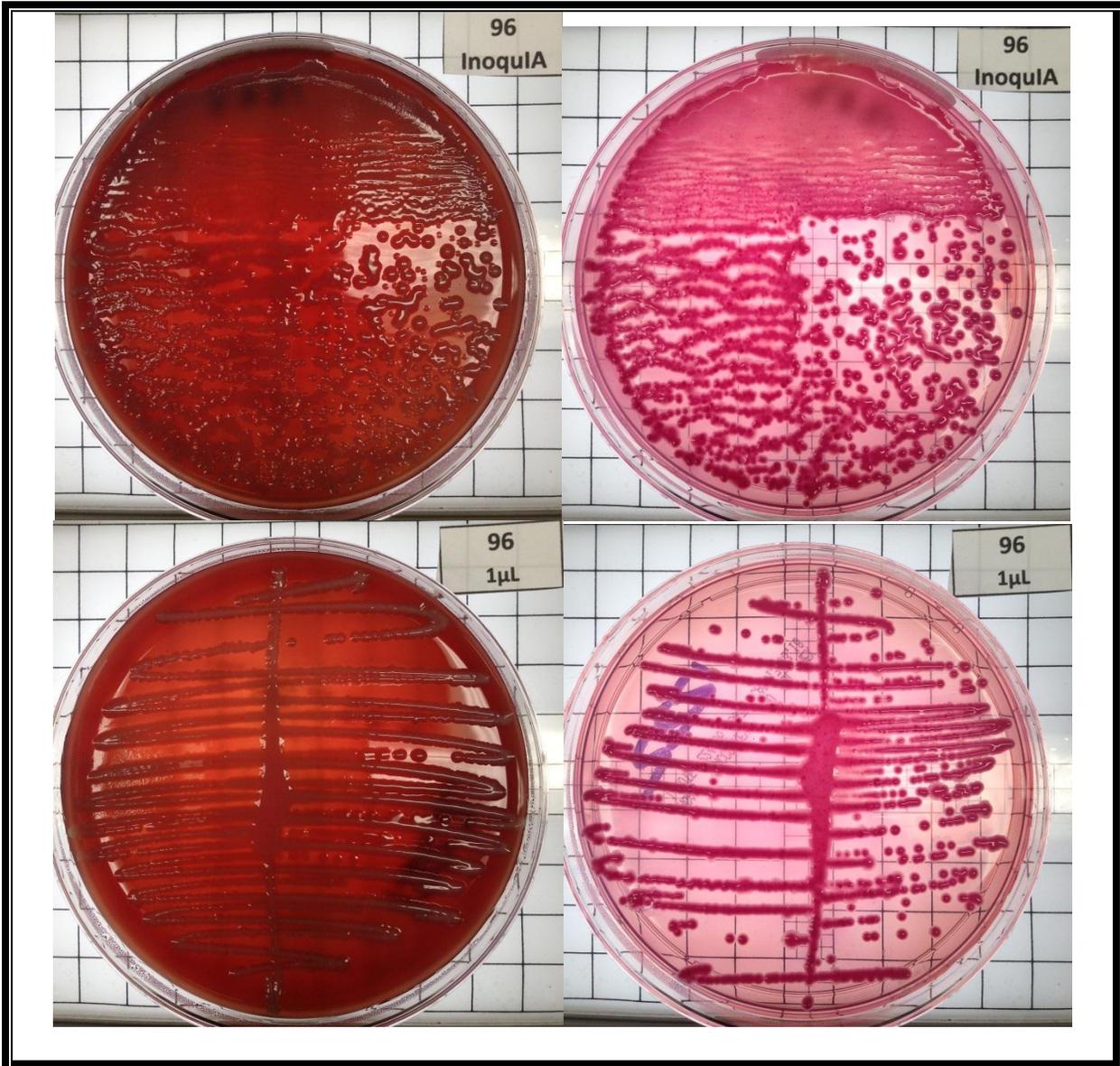
Aislamiento de colonias						
Criterio *	MC 10 µL		MC 1 µL		Kiestra Inoqula BD™	
	n	%	n	%	n	%
Bueno	27	44	26	43	50	82
Regular	29	48	27	44	8	13
Malo	5	8	8	13	3	5

*Bueno > 10 colonias aisladas, Regular de 5 – 9 colonias y Malo < 5

De los 61 casos positivos Kiestra Inoqula BD™ fue capaz de obtener 5 aislamientos dos diferentes tipos de colonia y con MC solo se encontraron 4 de los 5 casos encontrados por Kiestra Inoqula BD™ lo cual representa una mejora en recuperación de microorganismos presentes en muestras de orina, favoreciendo la identificación oportuna de agentes etiológicos causantes de infecciones en IVU cuando la infección es causada por dos microorganismos. En la *Figura 16* se muestra el caso donde Kiestra Inoqula BD™ fue capaz de aislar dos diferentes colonias en comparación con la siembra usando MC donde no se detecta la

presencia de éstas, se da seguimiento a ambas colonias aisladas con Kiestra Inoqula BD™ debido a que presentan cuenta suficiente según los criterios establecidos de > 50,000 UFC/mL.

Figura 16. Aislamiento de dos colonias morfológicamente diferentes obtenidas con Kiestra Inoqula BD™ vs. MC con inóculo de 1 µL.



Se muestra el hallazgo de dos colonias en agar con 5% de sangre de carnero sembradas en Kiestra Inoqula BD™ vs. MC 1µL solo se detecta un tipo de colonia, en agar Mac Conkey no se detecta diferencia en morfología de colonias entre ambos métodos. En las identificaciones realizadas se encuentra que existe la presencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* ambos agentes etiológicos comunes causantes de IVU.

Evaluación de contaminación cruzada

Se obtuvieron identificaciones de los agentes etiológicos presentes en los 61 casos de urocultivos positivos incluyendo el caso discordante en MC 1 μ L, fueron coincidentes en todos los casos entre método de identificación rápida Maldi-TOF donde se utilizó la cepa sembrada por equipo automatizado Kiestra Inoqula BD™ y la identificación por medio de Phoenix™ 100 BD utilizando la cepa sembrada por MC. En los casos de muestras negativas fue coincidente en ambos métodos sin presentar evidencia de contaminación en alguno.

Evaluación de tiempo de siembra con MC vs. Kiestra Inoqula BD™

En MC se toma el tiempo a partir del rotulado de placas de forma manual y hasta el término de estriado de placas necesarias para urocultivo, obteniendo un tiempo de 43 min llevando a cabo el procedentito establecido para no poner en riesgo la calidad del cultivo (Anexo 1), el tiempo obtenido con el uso de Kiestra Inoqula BD™ a partir del encendido del equipo fue de 27 min de los cuales el personal invirtió en prender el equipo revisar insumos, colocar las muestras en gradilla y programar el número de muestras ingresadas al equipo 12 min se toma como base el tiempo de MC para realizar los cálculos de porcentaje.

Tabla 8. Tabla de resultados de tiempo invertido por el personal entre MC vs. Kiestra Inoqula BD™

Método	Tiempo total de proceso		Tiempo invertido por el personal		% Ahorro de tiempo
	min	%	min	%	
MC 1 μ L	43	100	43	100	/
Kiestra Inoqula BD™	27	63	12	28	72

IX.- DISCUSIÓN

Este trabajo contiene la primera evaluación de siembra de muestras de orina utilizando el sistema automatizado Kiestra Inoqula BD™ en México. Este equipo tiene 6 patrones de dispersión para muestras de orina las cuales se diferencian en la distancia que hay entre cada estría y en otros equipos como MicroStick donde depende de las revoluciones por minuto (rpm) a la que gira la placa demostrado el trabajo realizado por Glasson J.H.^[13], por esta razón fue necesaria en primera instancia la selección de un patrón de dispersión que cumple con las necesidades básicas de este tipo de muestra, demostrándose que el patrón de dispersión 9 se adecua a éstas.

Los resultados de urocultivos positivos son dependientes de un conteo semicuantitativo medidas en UFC/mL por lo cual se realiza una platilla la cual relaciona concentraciones con un patrón visual que agiliza la interpretación de muestras positivas y negativas, fundamentada en el uso de concentraciones microbianas en escala de Mc Farland conocidas realizando diluciones en serie, este método ha sido utilizado anteriormente demostrando precisión y reproducibilidad reportado en el trabajo realizado por Iversen J.^[17]

Los resultados obtenidos de la concordancia es considerada “casi perfecta” utilizando muestras clínicas entre el MC y siembra automatizada entre urocultivos positivos y negativos, lo cual demuestra que la siembra automatizada suple de manera confiable la siembra con MC, en la discordancia presente en MC con inóculo de 1 µL cabe resaltar que presento un recuento bajo de UFC/mL y es probable que el uso de asas calibradas el cual tiene variación de ±50% de exactitud^[19] es el factor influyente en este caso en particular, y el equipo con la implementación de pipetas de precisión para el inóculo y perlas magnéticas para el estriado disminuye el error humano.

Sin embargo el equipo está expuesto a variaciones de calibración o programación lo cual está a cargo del personal capacitado para el uso del equipo, estas pueden ser controladas fácilmente al utilizar controles de volumen con concentraciones microbianas conocidas en escala de Mc Farland.^[24]

El uso de sistema automatizado en siembras de orina también demostró una mejor recuperación de colonias aisladas con 95 % de los casos con recuperación de regular a buena las cuales son suficientes para seguir el proceso sin necesidad de subcultivos, lo cual retrasa el

resultado hasta un día, esto ha sido comprobado en trabajos similares como el realizado en Suiza por Croxatto A. ^[8] donde demostró que el equipo Kiestra InoqulA BD™ es capaz de obtener mayor número de colonias discretas de manera reproducible en comparación a equipos similares. Esta capacidad del equipo nos permitió la identificación en ventaja de un caso más con dos agentes etológicos presentes en la orina con cuenta suficiente para continuar su proceso de identificación lo cual por MC debido a su baja reproducibilidad y a las variantes que interfieren que son difícilmente controlables como: el volumen de inóculo, esterilización de asa bacteriológica y la habilidad del personal para diseminar la muestra sobre la placa de agar, se hubiese omitido.

Es importante asegurar que el uso del sistema automatizado no pondrá en riesgo de contaminación las muestras que procese dentro del instrumento o por algún proceso mecánico. En esta evaluación se realizó la identificación en paralelo utilizando cepas sembradas con método automatizado Kiestra InoqulA BD™ vs MC y no hubo evidencia de contaminación entre muestras. Esto confirma que el uso de puntas de pipeta desechable y estéril evita cualquier posibilidad de contaminación cruzada.

El uso de sistemas automatizados como Kiestra InoqulA BD™ trae consigo una mejora en el desempeño de las tareas de importancia en el laboratorio de microbiología como es referido por Bourbeau P. ^[3] y disminución del tiempo empleado por los trabajadores para tareas de siembra la cual se demostró que es de 72% porcentaje similar al referido por Mutters N. ^[26] del 70%.

X.- CONCLUSIONES

- La concordancia obtenida entre Kiestra Inoqula BD™ y MC utilizando Kapa Cohen es de 0.989 considerada según el grado de acuerdo como casi perfecta, lo cual coloca a Kiestra Inoqula BD™ como un equipo de alta confiabilidad para el proceso de siembra.
- La utilización del patrón de dispersión 9 demostró ser reproducible en concentraciones y volúmenes de inoculación conocidos el cual facilita tener un patrón visual para interpretar cultivos semicuantitativos.
- En las muestras sembradas con Kiestra Inoqula BD™ se obtuvo en 95% de los casos positivos, una recuperación de colonias aisladas suficiente para seguir con los procesos de identificación y susceptibilidad antimicrobiana, evitando retrasar el resultado por la necesidad de subcultivos.
- No presenta evidencia de tener contaminación cruzada lo cual se debe al uso de puntas desechables para cada muestra.
- La implementación de tecnologías como Kiestra Inoqula BD™ en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Cancerología tiene el potencial de permitir la automatización de inoculación y estriado. Esto implica una estandarización en el proceso de siembra, ofreciendo un mejor aprovechamiento del tiempo laboral. Además de una mejora sustancial de mayor confiabilidad y reproducibilidad en los aislamientos.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ahmad, Naffees. , Phd., Lawrence, D. (2011) Sherris: “Microbiología Médica”. Infecciones en vías urinarias. (pp.708-711). 5ª Edición. México. Mc Graw Hill.
- [2] Alados J.C., Gómez E., Leiva J., Pérez J., Rojo E. (2014) Procedimientos en Microbiología Clínica. “Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica”. (pp. 11-16). 10ª Edición. Pérez Sáenz JL. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) Madrid
- [3] Bourbeau, P., Ledeboer, N. “Automatization in Clinical Microbiology”. Rev. J Clin Microbiol. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1658-65. doi: 10.1128/JCM.00301-13
- [4] Brooks, Geo. F., Morse, Stephen A., Carroll, Karen C., Mietzner, Timothy A., Butel, Janet S. (2010) Jawetz, Melnick y Adelberg: “Microbiología médica”. (pp. 159-163) 25ª Edición. México. Mc Graw Hill.
- [5] Bustamante, V., Meza, P., Román, J.C., García, P. “Evaluación de un sistema automatizado de siembra de orinas para urocultivos”. Rev. Chilena Infectología 2014; 31 (6): 670-675 <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000600005>
- [6] Casares, M. (2011) “Automatización en microbiología Clínica”. Rev. Acta Médica 2011; 13(1):30-37.
- [7] Collard Patrick. (1985) El desarrollo de la Microbiología. (pp. 1-5) Edición Cambridge University Press. Editorial Reveté, S.A. Barcelona.
- [8] Croxatto A., Dijkstra K., Prod’hom G., Greub G. (2015) “Comparison of Inoculation with the InoqulA and WASP Automated Systems with Manual Inoculation”. Rev. J Clin Microbiol. 2015 Jul;53(7):2298-307. doi: 10.1128/JCM.03076-14.
- [9] Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, “Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. 6.5 Infecciones de vías urinarias”. CIE-10(N39.0). http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5120943&fecha=20/11/2009
- [10] Domingo, A, A., Cacho, J., Coira, A., Lepe, J.A. (2010) Procedimientos en microbiología clínica. 14ª. “Diagnostico microbiológico de las infecciones del tracto urinario Recomendaciones de la sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica”. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
- [11] Forbes B., Sahn D., Weissfeld A., Trevino E. (2007) “Diagnostico microbiológico. Cultivos e identificación tradicionales”. (pp. 103-105). 12ª Edición. Madrid España Editorial Médica Panamericana

- [12] Fortún J. (2004) “Principales infecciones en el paciente oncológico: manejo práctico” Anales Sis San Navarra vol.27 supl.3 Pamplona.
- [13] Glasson, J H., Guthrie L H., Nielsen D J., FA. “Evaluation of and automated instrument for inoculating and spreading samples onto agar plates”. Rev.J Clin. Microbiol. 2008; 46(4) 1281-4. doi: 10.1128/JCM.01687-07
- [14] Guerrero, C., Sánchez, C. (2003) Procedimientos en microbiología clínica. 1a. recogida, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio de microbiología 2003. Recomendaciones de la sociedad Española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
- [15] Herve, B. “New technologies in microbiology: automatization and some applications in microbial identification and susceptibility tests”. Rev. Med. Clin. Condes 2015; 26(6) 753-763. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.004>
- [16] “Infección y neutropenia”. NIH Instituto nacional de cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios/infecciones> Fecha de consulta: 24/09/2017
- [17] Iversen J., Stendal G., Gerdes C., Meyer C., Ostergaard A., Frimodt N. (2016) “Comparative Evaluation of Inoculation of Urine Samples with the Copan WASP and BD Kiestra Inoqula Instruments”. Rev. J Clin Microbiol. 2016 Feb; 54(2):328-32. doi: 10.1128/JCM.01718-15.
- [18] Kalenic, S. “The Role of the Microbiology Laboratory”. Chapter 7. International Federation of Infection Control. 2016. IFIC Basic Concepts of Infection Control, 3rd edition.
- [19] Koneman, Elmer W., Allen, Stephen D., Dowell, V. R., Janda, William M., Sommers, Hernert M., Winn, Whashington C., (1998) “Diagnóstico microbiológico Texto y atlas color”. 3ª Edición. (pp. 11-12, 129, 138- 141, 170-171, 177- 178, 184-187,211-214.) 3ª Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- [20] Mac Farddin, J F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. “Estándares Nefelómetros de McFarland” (pp. 764-765). 3ª. Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- [21] Madigan, M. T., Matinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009) Brock “Biología de los microorganismos. Interacciones de los microorganismos con la especie humana (pp.903-9015) 12ª Edición. México. Pearson Addison Wesley.
- [22] Maldonado Regalado (2013) “Infecciones en el paciente oncológico”. Rev. Esp. Pediatr. 2013; 69 (3) 140 -154 Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. Universidad de Alcalá. <https://continuum.aeped.es/files/articulos/REP%2069-3%2022.pdf>

- [23] Martínez M. G. (2016). “Infección en vías urinarias”. Rev. Suplemento Hospital General de México. Octubre; 1 (1): 2-4.
- [24] Moreno, José L. (2016) “Validación analítica de Kiestra y métodos microbiológicos para el Centro Nacional de Referencia Salud Digna IAP”. Documento compartido por el autor.
- [25] Mühlhauser, M., Rivas, L. “Clinical microbiology laboratory: basic knowledge to a physician”. Rev Med. Clin. Condes 2014; 25(3) 569-579. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)
- [26] Mutters, N T., Hodiamont, C. J., de Jong, M., Overmeijer, H P., Van den Boogaard, M. Visser, C. E. “Performance of Kiestra Total Laboratory Automation Combined with MS in Clinical Microbiology Practice”. Rev. Ann Lab Med. 2014 Mar; 34(2):111-7. doi: 10.3343/alm.2014.34.2.111.
- [27] Notificación Semanal Casos Nuevos de Enfermedades (2017). Infección de vías urinarias (N30, N34, N39.0). Secretaria de Salud. (pp. 84) Información actualizada mes de Marzo.
- [28] Organización Panamericana de la Salud. (2011) Guía para el uso correcto de los equipos automatizados para identificación bacteriana y su correspondiente prueba de susceptibilidad. “Automatización del laboratorio”. (pp. 3-13) Biblioteca Sede OPS. Whashington. D.C.
- [29] “Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido Instituto nacional de estadística geográfica”.
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> fecha de consulta: 24/09/2017
- [30] Sahuanay B. Zaida P. (2015) “Evaluación del método directo para la identificación y antibiograma de Enterobacterias en Urocultivo de pacientes con bacteriuria significativa atendidos en el Hospital Docente Madre Niño San Bartolomé 2013-2014”. Lima Perú.
- [31] Sotomayor M., Ponce de León A., et al. (2015). “Recomendaciones de expertos mexicanos en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario en pacientes adultos, embarazadas y niños”. Rev Mex Urol 2015;75(2):1-46.
- [32] Strasinger, S., Di Lorenzo, M., (2008). “Análisis de orina y de los líquidos corporales- Examen de orina”. (pp. 100-101). 5ª Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- [33] Torres, M., Mattera, A. “Temas de bacteriología y virología médica”. (2006) Infección urinaria. (2ª Edición) Oficina del Libro FERMUR. (pp. 189-196).

XII.- ANEXOS

Anexo 1. Técnica de inoculación para muestras de orina (urocultivo).

Inoculación en placas de agar

1.- Para obtener un recuento semicuantitativo la orina debe ser previamente homogeneizada (moviéndola con suavidad para evitar la formación de espuma). Se emplean asas metálicas no ferrosas (níquel-cromo o platino) calibradas para contener 1 μ L ó 10 μ L de orina.



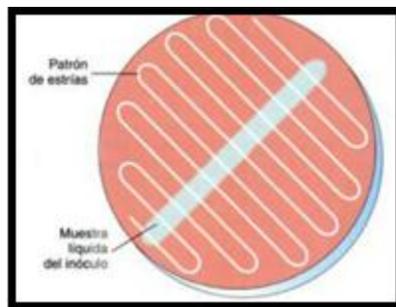
2.- Se esteriliza el asa en el mechero de Bunsen (Flama azul) de 5 a 10 segundos en posición vertical el filamento puesto al rojo vivo.



3.- Se retira de la flama y se deja enfriar aproximadamente 10 segundos dentro del campo estéril el cual alcanza un radio de esterilidad de 20 a 30 cm dependiendo la intensidad y el color de la flama.

4.- Para la obtención del volumen adecuado es importante introducir el asa inmediatamente por debajo de la superficie líquida y ascenderla verticalmente.

5.- Una vez tomada la muestra se lleva en todo su volumen a la superficie del agar haciendo una estría a través del centro, el inóculo se disemina en ángulos rectos respecto a la estría primaria. En medios agar con 5% de sangre de carnero y agar Mac Conkey.



5.- Se incuban las placas a una temperatura de 35 \pm 2 $^{\circ}$ C y se procede a interpretación a las 24h bajo los criterios establecidos descritos a continuación.

Los criterios descritos en la NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.

Se consideran significativos recuentos en orina:

Chorro medio: muestra obtenida con asepsia previa, mayor de 50,000 UFC/ml (una muestra).

Cateterismo: más de 50,000 UFC/ml (una muestra).

En caso de sonda de Foley: mayor de 50,000 UFC/ml (una muestra).

Punción suprapúbica: cualquier crecimiento es diagnóstico.

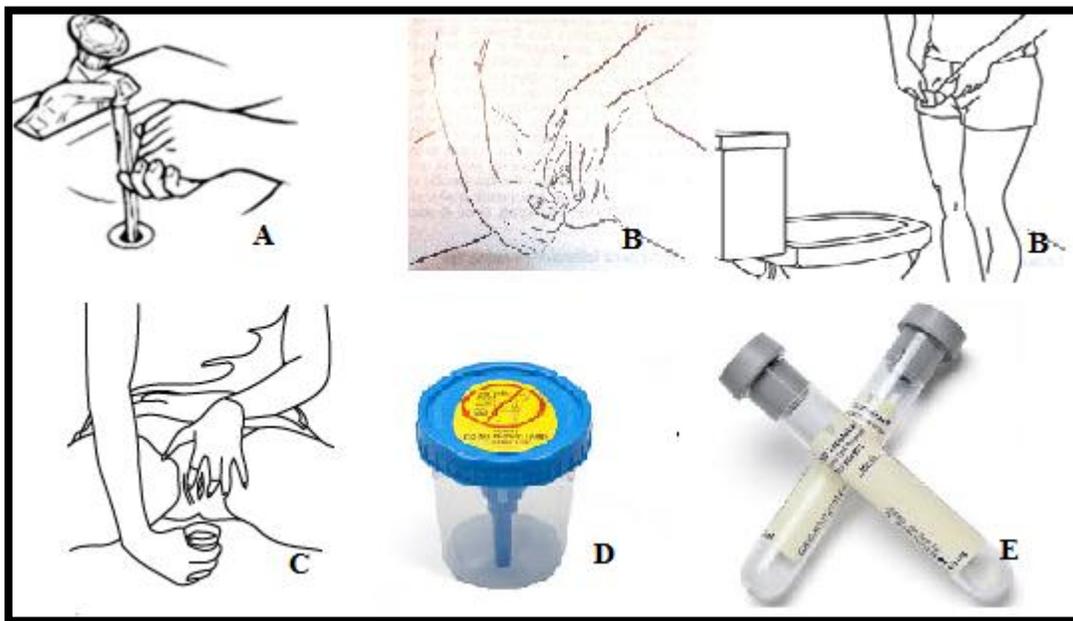
Urocultivo positivo: el hallazgo de un microorganismo en un recuento $> 50,000$ UFC/mL.

Urocultivo negativo: todo recuento menor a 50,000 UFC/mL ^[9]

Muestras polimicrobianas: la presencia de tres o más microorganismos. ^[19]

Anexo 2. Recolección de muestra

Recolección de muestra chorro medio



Recolección de orina de chorro medio con aseo previo. **A.** Lavado de manos antes de iniciar el procedimiento. **B.** Pacientes femeninos se separan los labios mayores con los dedos y en pacientes masculinos se contrae el prepucio, se limpia la zona con agua y jabón y se seca. **C.** Recolecta a chorro medio. **D.** frasco estéril de recolección. **E.** tubo tapón gris con conservador C&S conservante ácido bórico (muestra estable 48h).^[32]

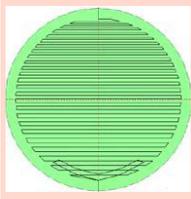
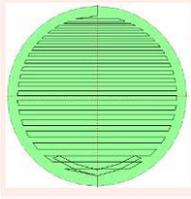
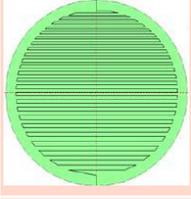
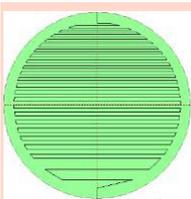
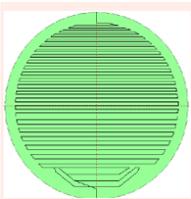
Recolección de muestra directo de catéter: Se realiza por personal especializado dentro del laboratorio o en el consultorio médico.

Recolección por punción suprapúbica: realizada únicamente por el especialista tomada con jeringa y transportada en tubo con conservador C&S conservante ácido bórico.

Recolección de sonda: Se realiza por personal capacitado del laboratorio con precauciones asépticas para evitar contaminación de muestra, se toma con jeringa de la orina que drena recientemente. No se aceptan muestras directas de la bolsa de recolección.

Anexo 3. Características de patrones de dispersión.

Características de patrones de dispersión recomendados para muestras líquidas de baja carga microbiana y orina. Según lo descrito en el manual del usuario del equipo Kiestra Inoqula BD™.

Imagen	No. Patrón	Separación	Tiempo	Forma
	4	2.5 mm a 1 mm	18 segundos	zigzag
	5	3.5 a 1 mm	15 segundos	zigzag
	7	Secuencias sin información en mm	15 segundos	zigzag
	9	Inicia con 1 mm, 1 mm a 2 mm, 2 mm a 3.5 mm	21 segundos	Zigzag dividiendo la placa en 3
	10	5 mm -2.5 mm 1 mm	17 segundos	zigzag
	11	1 mm a 2.5 mm separación	21 segundos	zigzag

Anexo 4. Características de Medios de cultivo utilizados.

Características de agar + 5% sangre de carnero.

Para aislamiento de bacterias exigentes y diferenciación de acuerdo a la actividad hemolítica.

La abundante base nutritiva proporciona condiciones óptimas de desarrollo a todos los microorganismos. La infusión de músculo cardiaco y la peptona, proporciona las fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. El cloruro de sodio actúa para mantener el equilibrio y la sangre para diferenciar el tipo de hemolisis.

Formulación: para 1L

Agar	15 g
Infusión de músculo cardiaco	10 g
Sangre de carnero éstrildesfibrinada	50 mL
Cloruro de sodio	5.0 g
Peptona de carne	10.0 g
Ajustar	pH 7.3 ±2

Cromo agar orientador

Es un medio no selectivo y diferencial para la identificación presuntiva de bacterias a partir de muestras clínicas, el cual los nutrientes son proporcionados por peptonas especialmente seleccionadas. La mezcla de cromógenos está formada por sustratos artificiales (cromógenos) que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas microbianas específicas lo que asegura la diferenciación de determinadas especies o la detección de un grupo bacteriano.

Formulación: para 1L

Cromopeptona	16.1 g
Mezcla cromogena	13 g
Agar	15.0 g
	pH 6.9 ±2



Escherichia coli

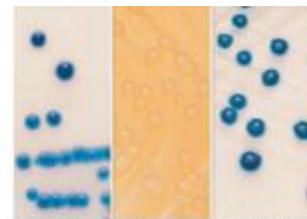


Staphylococcus aureus



Staphylococcus saprophyticus

Streptococcus agalactiae



Enterobacter cloacae

Proteus sp.

Klebsiella pneumoniae

Agar Mac Conkey.

Formulación: para 1L

Peptona	17 g
Polipeptona	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5 g
agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agua destilada hasta	litro
pH final= 7.1	

El agar Mac Conkey es un medio diferencial para la selección y recuperación de Enterobacteriaceae y bacilos gramnegativos entéricos relacionados.

Las sales biliares y cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y algunas bacterias gramnegativas exigentes.

La lactosa es el único hidrato de carbono. Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias con tonos variables de rojo debido a la conversión del indicador rojo neutro (rojo con un pH menos de 6.8) por la producción de ácidos mixtos. Las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa se ven incoloras o transparentes. ^[6]

Anexo 5. MALDI TOF

Descripción del proceso (MALDI TOF)

La identificación mediante MALDI-TOF MS se realizó sobre una colonia aislada, que fue depositada sobre una tarjeta de análisis (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, los pocillos fueron cubiertos con 1.5 µl ácido fórmico, secando dejando secar a temperatura ambiente y 1.5 µl de matriz [solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA; Bruker Daltonics) en 50% de acetonitrilo y 2,5% de ácido trifluoroacético].

Se utilizó un equipo Microflex LT y un software FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics).

El análisis de espectrometría de masas mediante la metodología hoy conocida como MALDI-TOF MS (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos en microbiología clínica.



Anexo 6. Phoenix metodología.

Inoculación manual de panel de identificación BD Phoenix

- 1.- Abrir el paquete de panel
Inocular dentro de 2 horas.



- 2.- Preparar Solución Phoenix™ ID

Inocular panel con preparado Solución ID dentro de (<) 60 MINUTOS.

Prepare ID Solución.

* Agregar organismo a ID Caldo.

* Agitar con Vortex

* Hacer .50 - .60 McFarland (Inóculo estándar)

ó

Hacer .20 - .30 McFarland (Inóculo bajo)

ó

Haga 2.00-2.40 McFarland (Inóculo de levadura).



- 4.- Después de la inoculación del panel, coloque los tapones para sellar el panel.
Prepare la placa de pureza. Usando un asa estéril, recupere una pequeña gota del fluido de inóculo antes o después de inocular el panel. Inocular una placa de agar (cualquier medio apropiado) para el control de pureza. Incubar las placas durante 18-24 horas o 18-48 horas para la levadura, a 35 ° C en condiciones apropiadas.



- 5.- Cargar panel (es) en el instrumento BD Phoenix dentro de (<) 30 MINUTOS después de la inoculación.



- 3.- Prepare Phoenix™ AST o AST-S Solución.

(ID / AST, paneles AST solamente)

Inocular el panel con caldo preparado dentro de (<) 30 MINUTOS.

PREPARE AST o AST-S

* Agregue una gota en caída libre de AST o AST-S Indicador

En AST o AST-S. El tubo se puede usar por hasta 2 horas si se expone a la luz o hasta 8 horas en la oscuridad. Mezcle por inversión.

* Agregue 25 µL de sol. ID preparado (inóculo estándar).

* Agregue 50 µL de sol. ID preparado (bajo inóculo).



BD Diagnostics
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152-0999
800.638.8663

Anexo 7. Correlación entre muestras procesadas en MC y automatizada con Kiestra Inoqula BD™

Calculo de tamaño de muestra.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, considerando todas las muestras de orina recibidas a diario en el laboratorio de microbiología del instituto Nacional de Cancerología que estén contenidas en tubo tapón gris con conservador.

El tamaño de muestra (n) fue obtenida mediante la fórmula general, a partir de una población de 700 pacientes, con un nivel de confianza del 95%, que equivale a una $\alpha = 0.05$ y una

$$z = 1.96.$$

Dónde:

n=tamaño de muestra	$n = \frac{Z^2 pqN}{NE^2 + z^2 pq}$
z= valor crítico (1.96 z para 95% de confianza)	
p= variabilidad positiva(50%)	
q= Variabilidad negativa(50%)	
N=tamaño de población	
E= precisión de error, dado el nivel de confianza 0.05	$n = \frac{1.96^2 * 0.5 * 0.5 * 700}{700 * 0.05^2 + 1.96^2 * 0.5 * 0.5} = 248$

Se trabajó con 248 muestras de orina seleccionadas al azar sembradas de forma manual con 10 y 1 μ L y automatizada 10 μ L utilizando el patrón 9 seleccionado utilizando el parámetro semicuantitativo establecido.

Anexo 8. Grado de concordancia Índice de concordancia Kappa

Valor del grado de acuerdo

El coeficiente kappa fue propuesto originalmente por Cohen (1960) para el caso de dos evaluadores o dos métodos, por lo que a menudo se le conoce como kappa de Cohen, y fue generalizado para el caso de más de dos evaluadores por Fleiss, por lo que a veces también se habla del índice kappa de Fleiss.

Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

**Valoración del coeficiente kappa
(Landis y Koch, 1977)**

Coefficiente kappa	Fuerza de la concordancia
0,00	Pobre (<i>Poor</i>)
0,01 - 0,20	Leve (<i>Slight</i>)
0,21 - 0,40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0,41 - 0,60	Moderada (<i>Moderate</i>)
0,61 - 0,80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0,81 - 1,00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)