

302827

4



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

INFLUENCIA DEL METABOLISMO BACTERIANO Y
DE LA SANGRE EN LA DETECCION DE
BACTERIEMIA POR EL SISTEMA BACTEC NR - 730

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
MARIA TERESA CADENAS MARTINEZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1996

FALLA A PAGINA ORIGEN



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 está 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.

"LA REALIZACION ES EL SIMBOLO TRASCENDENTAL DE
LOS VALORES E IDEALES DEL SER HUMANO"

AGRADEZCO:

A DIOS,

POR DARME EL PRIVILEGIO DE AMAR, PORQUE TODOS LOS EXITOS
SE LOGRAN CON AMOR Y EMPEÑO.

A MIS PADRES:

CARLOS, POR SU AMOR Y EJEMPLO DE LUCHA CONSTANTE PARA
SALIR A LA LUZ DE LA VIDA.

TERE, POR DARME SU AMOR Y APOYO EN TODOS LOS ASPECTOS;
ASI COMO SUS SACRIFICIOS PARA QUE YO CONCLUYERA MIS ES-
TUDIOS PROFESIONALES.

¡LOS AMO!!

A MIS HERMANAS, SOL Y KARLA

POR AYUDARME A ALCANZAR MI MAS GRANDE ANHELO.

A MIS ABUELITOS.

POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO.

A MIS AMIGAS: LUCHY, MONICA, ANA MARIA, VIRGINIA, CLAUDIA
Y SILVIA:

POR COMPARTIR MIS TRIUNFOS.

A LAS RELIGIOSAS DE MARIA INMACULADA.

POR SU CARINO Y APOYO DURANTE ESTOS AÑOS.

A LA Q.F.B. MA. DEL ROSARIO YAZQUEZ LARIOS. Y AL DR. EDUARDO
RIVERA MARTINEZ.

POR APOYARME Y CREER EN MI ¡GRACIAS!

A LA UNIVERSIDAD MOTOLINA,

POR EXISTIR.

El presente trabajo se realizó en el Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo la dirección del McM. Dr. Eduardo Rivera Martínez y la Q.F.B. Ma. del Rosario Vázquez Larios.

INDICE

	Pág.
CAPITULO I	
INTRODUCCION	
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Hipótesis	2
CAPITULO II	
ANTECEDENTES	
2.1. Generalidades de bacteriemias	3
2.1.1. Clasificación de bacteriemias	3
2.2. Factores que influyen en la velocidad de recuperación de los microorganismos	4
2.3. Métodos de diagnósticos	5
2.4. Sistema no radiométrico BACTEC	6
2.4.1. Factores que afectan el valor de corte para considerar los hemocultivos positivos	8
2.5. Metabolismo bacteriano	8
2.5.1. Principales vías metabólicas de los carbohidratos	9

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo	14
3.2. Material de laboratorio, medios de cultivo, reactivos y equipo	15
3.2.1. Material biológico	15
3.2.2. Material de laboratorio	15
3.2.3. Medios de cultivo	15
3.2.4. Equipo	16
3.2.5. Varios	17
3.2.6. Sistemas comerciales	17
3.3. Metodología	17
3.3.1. Diseño de estudio	17
3.3.2. Procedimiento para la lectura de los hemocultivos por el sistema BACTEC NR-730	18
3.3.3. Identificación de los microorganismos aislados de los hemocultivos positivos	19

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados	20
4.2 Discusión	25

CAPITULO V

CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	32

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El aislamiento rápido de los agentes etiológicos de las bacteriemias sigue siendo una de las funciones más importantes del laboratorio de Microbiología.

Para la detección del crecimiento bacteriano en hemocultivos, existen principalmente dos sistemas: los sistemas convencionales y los no convencionales, de éstos últimos los sistemas automatizados tienen como ventaja mayor rapidez, sensibilidad y evitan la resiembra ciega.

De los sistemas automatizados, el sistema Bactec (Becton Dickinson) es el más utilizado, este sistema detecta niveles de concentración de CO_2 producido por el metabolismo de los microorganismos mediante radiometría, espectrofotometría o fluorometría (6,10). La mayoría de los hospitales utilizan el sistema espectrofotométrico, por no requerir de materiales radioactivos. El proveedor del sistema recomienda un valor de corte de los índices de presión de CO_2 (igual o mayor 42 unidades) para considerar los hemocultivos positivos; sin embargo, se ha observado que en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCh) este valor proporciona un porcentaje demasiado elevado de hemocultivos con valores falsos positivos. Esta discrepancia ha sido también informada por varios autores, quienes sugieren ajustar los valores de corte recomendados por la casa comercial al hospital donde se utilice este sistema de detección de bacteriemias (5,18,19).

Se postula que el punto de corte que se refiere a la cantidad de CO_2 que se detecta en los frascos, el cual es producido por el metabolismo de los microorganismos puede variar, dependiendo de la presión atmosférica y probablemente de la presión parcial de CO_2 en el ambiente; puede cambiar también por el estado fisiológico del paciente (5,17).

Por lo anteriormente expuesto, se decidió investigar que características fisiológicas del paciente ocasionan valores de crecimiento elevado, llegando a sugerir hemocultivos positivos cuando realmente no lo son (falsos positivos).

1.2. OBJETIVOS.

- Determinar si algunas características inherentes en los pacientes se correlacionan con la presencia de valores falsos positivos en las lecturas de CO₂ de hemocultivos BACTEC, en el INCICh.
- Investigar si hay relación entre el microorganismo aislado y el valor de crecimiento obtenido, así como en la rapidez de incremento de producción de CO₂ detectada por el sistema Bactec.

1.3. HIPOTESIS.

- Existen características específicas en los pacientes tales como la cantidad de células sanguíneas, la glucosa, la presión parcial de CO₂ y la hemoglobina que pueden incrementar la cantidad de CO₂ detectada en los hemocultivos del sistema Bactec, dando como resultado valores falsos positivos, en cambio otros como el colesterol no tienen relación con la cantidad de CO₂ en los hemocultivos.
- Es posible determinar un perfil de producción de CO₂ dependiente del tipo de microorganismo en hemocultivos positivos.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE BACTERIEMIAS.

Las bacteriemias ocupan un lugar muy importante dentro de las enfermedades infecciosas, tanto por su frecuencia como por su gravedad ya que además de la invasión de los microorganismos al torrente circulatorio, se favorece la diseminación de los mismos a todo el organismo, afectándose con ello, el funcionamiento de diferentes órganos que pueden conducir a la muerte del paciente. Una bacteriemia se define como la presencia de microorganismos en la sangre, y puede indicar la existencia de un foco infeccioso intravascular como endocarditis o extravascular como una neumonía o un absceso hepático, pudiendo también representar simplemente el paso transitorio de bacterias a la sangre (12).

2.1.1. CLASIFICACION DE BACTERIEMIAS.

Las bacteriemias se clasifican en tres grupos:

- i) **Bacteriemia transitoria:** Es el paso breve y rápido de bacterias al torrente sanguíneo por un evento traumático menor, los microorganismos son eliminados rápidamente por el sistema reticuloendotelial. El número de microorganismos es mínimo, por lo general menor de 30 microorganismos por mililitro de sangre.

- ii) **Bacteriemia intermitente:** Esta relacionada a procesos infecciosos localizados, como abscesos, neumonías, infecciones de vías urinarias etc. Los microorganismos se encuentran en sangre y posteriormente son eliminados por el sistema retículo endotelial o se sitúan en otro órgano.

iii) **Bacteriemia continua:** Se presenta en casos de infecciones intravasculares tales como: endocarditis, en infecciones severas no controladas, y en la fase aguda de infecciones del sistema retículo endotelial (vgr. Fiebre tifoidea). En este tipo de bacteriemias la presencia de microorganismos es continua en el torrente sanguíneo (2).

Operacionalmente, se considera bacteriemia real cuando al menos 2 hemocultivos muestran desarrollo del mismo microorganismo o cuando el microorganismo desarrollado en un solo hemocultivo es el mismo que se aísla del sitio de origen de la bacteriemia. Y bacteriemia ficticia cuando el microorganismo aislado es de un solo hemocultivo y no corresponde al agente causal del foco infeccioso primario (6,23).

2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE RECUPERACION DE LOS MICROORGANISMOS.

Los factores que intervienen en la velocidad y tasa de recuperación de los microorganismos en las bacteriemias, se citan en el tabla 1 (6).

Tabla 1. Variables que afectan la velocidad y tasa de recuperación de los microorganismos en los sistemas de hemocultivos.

Medios de cultivo (medios enriquecidos)
Anticoagulantes y otros aditivos PSS y resinas)
Dilución medio de cultivo -sangre (1:5 o 1:10)
Incubación (temperatura, atmósfera y tiempo)

2.3. METODOS DE DIAGNOSTICO.

Existen dos tipos de métodos de diagnóstico para la detección de hemocultivos positivos: los métodos convencionales y los métodos no convencionales.

i) Métodos convencionales.- Uno de los métodos convencionales más utilizados es el método bifásico de Ruiz Castañeda, que contiene medios de cultivo con fórmulas enriquecidas de factores de crecimiento, con el fin de permitir la detección de las bacterias aerobias estrictas y anaerobias responsables de bacteriemias.

ii) Métodos no convencionales. Existen varios métodos no convencionales que se describen a continuación:

a) Lisis centrifugación.- Este sistema que se encuentra en el comercio como ISOLATOR (Dupont de Nemours & Co), el cual consiste en un tubo con doble tapón que contiene saponina para lisar las células sanguíneas, propilenglicol para disminuir la espuma, polianetolsulfonato sódico como anticoagulante y el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) para complejar los iones calcio y así inhibir la cascada del complemento y la coagulación; además de un compuesto fluorado inerte para amortiguar y concentrar los microorganismos durante una centrifugación de 30 minutos. Una vez finalizada la centrifugación se descarta el sobrenadante, el sedimento se agita vigorosamente y se inocula en diferentes medios de cultivo (6,12).

b) Subcultivo incluido.- El método de subcultivo incluido denominado Septi Chek (Roche Diagnostics) consiste en una botella convencional para hemocultivo a la cual se le ha unido una cámara que contiene una lámina de vidrio con tres medios de cultivo diferentes. Para realizar el subcultivo se invierte la botella, poniendo en contacto todo el caldo con la superficie de los tres medios de cultivo, permitiendo una detección mucho más rápida de los microorganismos (6,12,24).

c) Sistemas automatizados.- Actualmente la mayor parte de los laboratorios cuentan con sistemas automatizados, encontrándose diversos tipos de sistemas, los cuales utilizan la radiometría, la espectrofotometría o la fluorometría para la detección en la positividad de los hemocultivos en relación a la producción de CO_2 por el metabolismo microbiano (5,6,9,10).

2.4. SISTEMA NO RADIOMETRICO BACTEC.

Actualmente de los sistemas automatizados, el sistema más utilizado es el denominado BACTEC de Becton Dickinson, en su versión BACTEC no radiométrica (BACTEC NR), que detecta el CO_2 producido por el metabolismo microbiano por espectrofotometría infrarroja.

Este sistema funciona de la siguiente forma: el instrumento selecciona el gas de cultivo adecuado para reemplazar el volumen de gas removido por el instrumento en el análisis, después la bomba neumática transfiere el gas al sistema de medición donde la concentración de bióxido de carbono (CO_2) es medida por espectrofotometría infrarroja (Figura 1). Esta cantidad es convertida a un número llamado valor de crecimiento, el cual representa la cantidad de CO_2 sobre el gas de cultivo de referencia; entre más alto sea el contenido de CO_2 , más alto será el valor de crecimiento. El instrumento compara cada valor de crecimiento leído en cada frasco con el valor del umbral previamente definido para determinar los hemocultivos positivos. Cualquier lectura que exceda estos valores del umbral es considerada significativa (6,17).

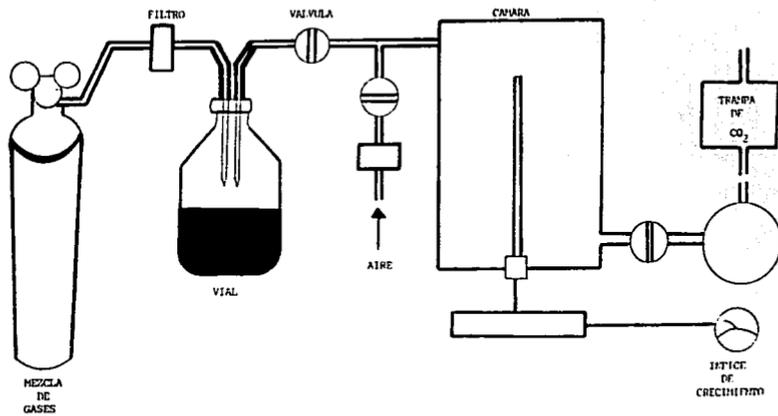


Fig.1. DIAGRAMA DEL SISTEMA BACTEC IR-730

2.4.1. Factores que afectan el valor de corte para considerar los hemocultivos positivos.

El valor de corte estipulado para considerar los hemocultivos positivos por la casa comercial no es absoluto, ya que los valores obtenidos pueden ser afectados por varios factores que pueden ocasionar problemas en la especificidad y sensibilidad del sistema.

La detección del crecimiento microbiano en los hemocultivos depende de varios factores que incluyen: el volumen de sangre inoculada, la composición del medio de cultivo, las variaciones en la composición y la concentración de CO_2 de cada lote de frascos de hemocultivos. Por otro lado, también influye el número y tipo de microorganismos que presenta la sangre del paciente; así como por el estado fisiológico del paciente en relación a la presión parcial de CO_2 en sangre y la concentración de leucocitos (6,8,19).

Asimismo, se ha informado que la cantidad de CO_2 presente en el medio ambiente del instrumento afecta la cantidad detectada por el sistema modificando el valor de corte (5).

2.5. METABOLISMO BACTERIANO.

La función del metabolismo microbiano consiste en mantener y sintetizar los componentes celulares, necesarios para su crecimiento y para lo cual los microorganismos llevan a cabo, al igual que otros seres vivos, vías metabólicas. Existen numerosos sustratos entre los que se encuentran carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. Para la mayoría de los microorganismos, los compuestos de preferencia son los carbohidratos, especialmente la glucosa y su utilización depende de la presencia o ausencia de las enzimas que intervienen en las secuencias específicas de cada reacción.

2.5.1. Principales vías metabólicas de los carbohidratos.

El modelo general para el uso de todos los carbohidratos es su paso por un número reducido de vías centrales para el catabolismo de unos cuantos azúcares-fosfato claves. Las enzimas de estas vías degradan los azúcares-fosfato a compuestos de bajo peso molecular, principalmente piruvato, acetato y dióxido de carbono. El piruvato raramente se acumula como un producto y es metabolizado a productos de fermentación o productos oxidados y posteriormente a CO_2 y H_2O .

Los microorganismos utilizan principalmente las siguientes vías catabólicas para la glucosa:

- a) Vía Embden-Meyerhof-Parnas.
- b) Vía Entner-Douderoff.
- c) Vía hexosa monofosfato de Warburg-Dickins.
- d) Ciclo del ácido tricarbóxico.

a) Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La vía Embden-Meyerhof- Parnas se ha denominado vía glucolítica o anaerobia, debido a que la glucosa es degradada en ausencia de oxígeno y es utilizada por bacterias anaerobias y anaerobias facultativas. Esta vía glucolítica de transformación hacia piruvato y el metabolismo de éste constituyen la base de diversas reacciones microbianas. Las bacterias homofermentativas, como los estreptococos y algunos lactobacilos, producen lactato a partir del piruvato, mientras que las bacterias heterofermentativas como las enterobacterias, producen una mezcla de compuestos, además del ácido láctico.

Las etapas de la vía EMP comprende la fosforilación inicial de la glucosa, la fructosa 1,6 difosfato, que se escinde en dos unidades de tres átomos de carbono, que son oxidadas, a su vez a ácido pirúvico. En el paso de oxidación del gliceraldehído-3-fosfato se pierden un par de electrones. En ausencia de oxígeno, este par de electrones puede utilizarse para

reducir el ácido pirúvico a ácido láctico o a otras sales orgánicas formando los llamados ácidos mixtos. Dichos ácidos son productos finales del metabolismo de la glucosa por la vía EMP, y son las responsables de la caída del pH en las pruebas de fermentación empleadas para la identificación de bacterias. Las bacterias que poseen los sistemas enzimáticos apropiados pueden seguir degradando estos ácidos mixtos a alcoholes, gas, CO_2 y otros compuestos orgánicos (figura 2).

b) Vía Entner-Doudoroff. La vía Entner-Doudoroff es también llamada aerobia, ya que requiere oxígeno para que tenga lugar a la glucólisis. La glucosa tiene una fosforilación y posteriormente lleva a cabo una oxidación, llevando a la glucosa a 6-fosfogluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato antes de la formación de ácido pirúvico. Las bacterias oxidativas transfieren los iones hidrógeno disponibles del ácido pirúvico al ciclo de Krebs, donde finalmente se unen al oxígeno elemental para formar agua (figura 3).

c) Vía hexosa monofosfato de Warburg Dickins. Esta ruta de degradación de carbohidratos lleva aparejada la formación de fosfatos de azúcares de seis átomos (hexosas monofosfatos) y de cinco átomos de carbono (pentosa monofosfatos). La glucosa se puede oxidar esta vía con liberación de pares de electrones, que pueden entrar en la cadena de transporte electrónico; sin embargo, no se considera como una de las principales vías de producción de energía. La vía de las pentosas fosfato se utiliza principalmente para la biosíntesis, ya que aporta estas sustancias que se emplean en la biosíntesis de nucleótidos.

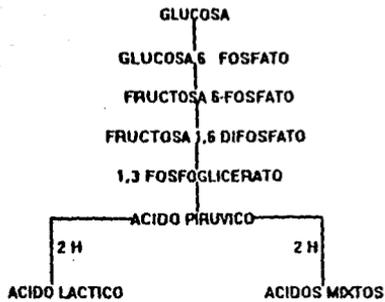


FIG. 2. Via Embden-Meyerhof-Parnas.

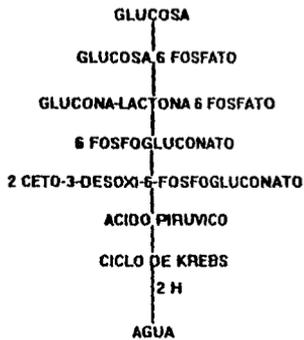


FIG. 3. Via Entner-Doudoroff.

La mayoría de las reacciones que intervienen en el camino por vía de pentosas fosfatos son idénticas a las que intervienen en la glucólisis, las diferencias son que la degradación de glucosa-6-P requiere oxígeno y que utiliza la coenzima NADP en vez de NAD (figura 4).

d) Ciclo de Krebs. A esta vía metabólica se le conoce también como ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sirve para la oxidación completa del piruvato y constituye un eslabón clave del metabolismo, ya que muchos de sus compuestos intermedios pueden alimentar rutas de biosíntesis de aminoácidos, pirimidinas, tetrapirroles y lípidos. Comprende la fase aeróbica de la oxidación de la glucosa y es donde se obtiene un mayor rendimiento de energía. El ciclo comienza con una condensación de acetil CoA con oxaloacetato para dar citrato, un ácido tricarboxílico de seis carbonos. Las reacciones restantes constituyen un mecanismo para oxidar la unidad condensada de acetilo del acetil CoA hasta CO_2 y H_2O con regeneración del oxaloacetato necesario para iniciar el ciclo (figura 5). (4,11,14,16,21).

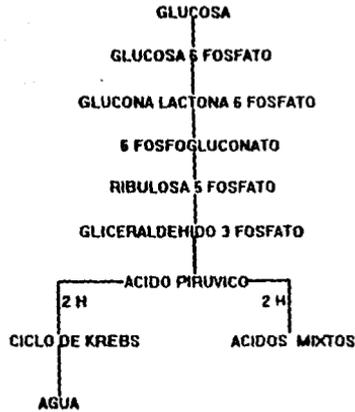


FIG. 4. Vía hexose monofosfato de Werburg-Dickins.

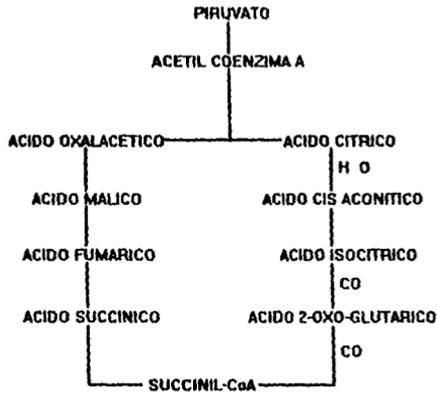
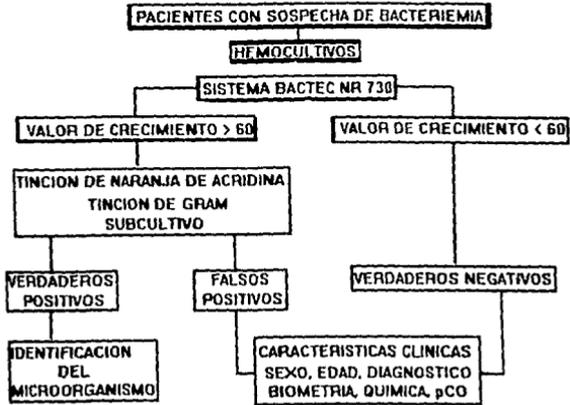


FIG. 5. Ciclo de Krebs. 13

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo



3.2. MATERIAL DE LABORATORIO, MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1. Material biológico.

Se utilizaron 1516 hemocultivos de 52 pacientes provenientes del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" correspondientes al período de enero de 1994 a junio de 1994.

3.2.2. Material de laboratorio.

Portaobjetos
Cajas petri

3.2.3. Medios de cultivo.

i) Generales

Gelosa sangre
Gelosa chocolate
Agar MacConkey

ii) Especiales.

1. Frasco de cultivo aeróbico Bactec Plus 26 y Bactec Peds Plus:

Agua desmineralizada
Caldos de soja-caseína
Extracto de levadura
Dextrosa
Sacarosa
Hemina
Menadiona

Polianetosulfonato sódico
Piridoxal HCl (vitamina B₆)
Resina adsorbente no iónica
Resina intercambio catiónica

2. Frasco de cultivo anaerobico Bactec Plus 27:

Agua desmineralizada
Caldo de soja-caseína
Extracto de levadura
Dextrosa
Fructosa
Arginina
Digerido de tejido animal
Hemina
Menadiona
Polianetosulfonato sódico
Citrato sódico
Fosfato potásico
Tioles
Resina adsorbente no iónica
Resina intercambio catiónica

3.2.4. Equipo.

Incubadora de CO₂ Heraeus.
Incubadora-Agitadora Lab-Line.
Microscopio de campo claro Karl-Zeiss.
Microscopio de fluorescencia Olympus.
BACTEC NR-730 Becton Dickinson.

3.2.5. Varios.

Equipo para tinción de Gram.

Equipo para tinción de naranja de acridina.

3.2.6. Sistemas comerciales.

Paneles de identificación:

- Panel Combo positivo 6 MicroScan Baxter Diag. Inc.

- Panel Combo negativo 2 MicroScan Baxter Diag. Inc.

3.3. METODOLOGIA.

3.3.1. Diseño del estudio.

1. Se utilizaron tres grupos de 50 hemocultivos cada uno: el primero que se utilizó como grupo control (verdaderos negativos), un grupo de hemocultivos falsos positivos y un grupo de hemocultivos verdaderos positivos, considerando los siguientes criterios para su clasificación:

i) **Falsos positivos.**- Los hemocultivos que presentaron un valor de crecimiento igual o mayor a 60 y que en el subcultivo y tinción con naranja de acridina no mostraron la presencia de microorganismos.

ii) **Falsos negativos.**- Los hemocultivos que presentaron un valor de crecimiento menor de 60.

iii) Verdaderos positivos. - Los hemocultivos que presentaron un valor igual o mayor a 60 y que mediante la tinción de Gram se observen microorganismos y se aislen por subcultivo. Asimismo, se consideraron los valores de crecimiento de acuerdo al microorganismo aislado y al tiempo de incubación.

2. Se realizó una revisión de los expedientes de cada paciente seleccionado durante el período antes descrito; considerando los siguientes datos: el sexo, la edad, el diagnóstico, y las concentraciones de hemoglobina, leucocitos, glucosa, pCO₂ y colesterol.

3.3.2. Procedimiento para la lectura de los hemocultivos por el sistema Bactec NR 730.

1. Analizar los hemocultivos aerobios dos veces al día en las primeras 48 horas y una vez al día durante los siguientes 7 días y hacer nuevamente una lectura a los 14 días, y en caso de sospecha de endocarditis infecciosa analizar nuevamente los hemocultivos al concluir 28 días.

2. Realizar únicamente una lectura, en el caso de los hemocultivos anaerobios durante los primeros 7 días, a los 14 días y en caso de sospecha de endocarditis infecciosa al concluir los 28 días.

3. Examinar los frascos a simple vista, antes de efectuar cualquier análisis con el instrumento, a fin de detectar posibles indicios de crecimiento. En caso afirmativo, los frascos considerarlos positivos sin la necesidad de analizarlos en el instrumento.

4. Efectuar un subcultivo de los frascos positivos en gelosa sangre, gelosa chocolate y agar MacConkey.

5. Preparar dos portaobjetos teñidos mediante la tinción de Gram, y naranja de acridina respectivamente, de los frascos de hemocultivos que tuvieron lecturas iguales o mayores de 60, en los frascos BACTEC PLUS 26 y 27; y mayor o igual a 40 en los PED PLUS, y que por lo tanto se consideraron hemocultivos positivos (la casa comercial indica un valor de corte de igual o mayor de 42 y 30 para los hemocultivos BACTEC PLUS 26, 27 y PED PLUS respectivamente; sin embargo, por la experiencia en nuestro Instituto, este valor de corte se tuvo que modificar, para eliminar un alto porcentaje de hemocultivos falsos positivos). En este punto, también es importante tomar en cuenta los incrementos de estos valores en los intervalos de los días, para detectar posibles hemocultivos positivos; el criterio de delta GV para la detección de una muestra positiva se define como un cambio en el valor de crecimiento del orden de 10 a 20 unidades entre dos lecturas consecutivas.

6. Observar los frotis, para investigar la presencia de microorganismos (17).

3.3.3. Identificación de los microorganismos aislados de los hemocultivos positivos.

1. Identificar a los microorganismos aislados de hemocultivos positivos por el sistema automatizado MicroScan, que se basa en métodos convencionales (1).

CAPITULO IV

4.1. RESULTADOS.

Durante el período de estudio se recibieron 1516 hemocultivos, de estos el 13.5% (206) fueron falsos positivos, el 11.8% (179) fueron positivos y 74.7% fueron verdaderos negativos.

De los 1516 hemocultivos se seleccionaron 50 hemocultivos consecutivos, de cada grupo de estudio: verdaderos negativos, falsos positivos y verdaderos positivos.

La tabla 1 muestra los datos demográficos de los pacientes en los grupos de hemocultivos verdaderos negativos y falsos positivos, observándose que la edad promedio de los pacientes seleccionados es 40.7 años y 56.76 años respectivamente y cierto predominio de pacientes del sexo masculino en el grupo de verdaderos negativos.

No se encontraron diferencias importantes en cuanto al diagnóstico de los pacientes en ambos grupos siendo la mayoría de ellos pacientes con cardiopatía isquémica.

Al comparar los datos de laboratorio seleccionados entre los grupos de estudio, se encontró que la cantidad de leucocitos, la concentración de glucosa y la pCO_2 en sangre fueron significativamente mayores en los pacientes con hemocultivos falsos positivos, no existiendo diferencias en la hemoglobina y el colesterol (Tabla 2).

Al dicotomizar los resultados de laboratorio en valores normales y anormales, la comparación mostró que los hemocultivos falsos positivos en este sistema se presentan significativamente con mayor frecuencia en los pacientes que tienen valores anormalmente altos de leucocitos y glucosa teniendo un riesgo de hemocultivo falso positivo 8 veces mayor si la glucosa o los leucocitos están anormalmente elevados. Asimismo los pacientes adultos tienen 15 veces más riesgo de tener un hemocultivo falsamente positivo en comparación con pacientes pediátricos (Tabla 3).

Al analizar el grupo de hemocultivos positivos, se encontraron 15 cepas de estafilococos, 9 de estreptococos y 18 de bacilos gramnegativos fermentadores, 5 de no fermentadores, un microorganismo fastidioso (*Campylobacter laridis*) y una *Candida tropicalis*. Los valores de crecimiento más elevados se presentaron en el grupo de bacilos gramnegativos fermentadores seguido de los estreptococos y estafilococos (Tabla 4).

Comparando los valores de crecimiento al momento de determinar el hemocultivo como positivo (V.c.), a las 24 y 48 horas de los bacilos gramnegativos, se observó que los bacilos gramnegativos fermentadores muestran valores significativamente más elevados que los no fermentadores tanto al momento de ser determinados como positivos como a las 24 hrs. de incubación, no siendo posible efectuar el análisis a las 48 y 72 hrs ya que solo 1 hemocultivo fue determinado como positivo a las 48 hrs y ninguno a las 72 hrs. (Tabla 5).

Aún cuando el tiempo promedio de incubación para detectarse como hemocultivo positivo no fue significativamente diferente entre los bacilos gramnegativos fermentadores (14.05 ± 11.5 hrs.) y no fermentadores (22.4 ± 8.7 hrs.) si se encontró una tendencia a ser menor el tiempo requerido en los bacilos gramnegativos fermentadores. En el caso de los cocos grampositivos (28.4 ± 16.7 hrs.) el tiempo promedio requerido fue aún mayor.

TABLA 1. Datos demográficos de los pacientes con hemocultivos verdaderos negativos y falsos positivos en el sistema Bactec NR-730.

	Falsos (+)	Verdaderos (-)
EDAD PROMEDIO	56.76	40.79
SEXO PROMEDIO		
Masculino	24	32
Femenino	26	18
DIAGNOSTICO PROMEDIO		
Cardiopatía isquémica	38	31
Congénita	2	8
Renales crónicos	2	0
Infecciosos	4	0
Neumopata	0	3
Vahular	2	4
Sida	1	1

TABLA 2. Comparación de los parámetros de laboratorio de los pacientes con hemocultivos falsos positivos y verdaderos negativos en el sistema Bactec NR 730.

	Falsos (+)		Verdaderos (-)		p
	X	D.E.	X	D.E.	
Hemoglobina (g/dl)	12.3	2.2	12.1	2.1	0.47
Leucocitos ($10^3/mm^3$)	14.6	9.4	9.0	3.6	<.001
Glucosa (mg/dl)	215.1	142.0	111.63	45.6	<.001
pCO₂ (mm Hg)	35.5	23.4	30.2	7.8	<.001
Colesterol (mg/dl)	171.5	60.1	154.2	55.3	0.350

D.E.= Desviacion Standard, P= probabilidad.

Tabla 3. Relación de los parámetros de laboratorio significativos dicotomizados con los hemocultivos falsos positivos y verdaderos negativos en el sistema Bactec NR 730.

	Falsos (+)	Verdaderos (-)	p	RM	C.I. 95%
Leucocitos >7.8 ($10^3/mm^3$)	35	13	0.0012	7.53	1.9 - 30
Leucocitos <7.9 ($10^3/mm^3$)	5	14			
Glucosa <115 (mg/dl)	8	28	0.00002	7.9	2.7 - 23
Glucosa >114 (mg/dl)	41	18			
Hemoglobina <12 (mg/dl)	20	15			
Hemoglobina >11 (mg/dl)	22	16	0.863	1.03	0.3 - 2.8
Edad <16	1	12			
Edad >15	49	38	0.0029	15.47	1.9 - 80

p = Probabilidad de la distribución de χ^2 ; RM = Razón de momios, C.I. 95% = Intervalo de confianza 95%

Tabla 4. Valores de crecimiento del sistema Bactec NR-730 de los microorganismos aislados de hemocultivos al momento de ser determinados como positivos.

(n)	X	D.S.
Cocos gram (+)		
Estreptococos (9)	157	73.7
Estafilococos (15)	148.5	61.5
Bacilos gram (-)		
Fermentadores (18)	204.3	84.1
No fermentadores (5)	89	33.9

Tabla 5. Comparación de los valores de crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores (18) y no fermentadores (5) aislados de hemocultivos en el sistema Bactec NR-730 al momento de ser determinados como positivos (V.c.), a las 24 y 48 hrs.

Bacilos gram (-)	V.c.	24 Hrs.	48 Hrs.
	X ± D.S.	X ± D.S.	X ± D.S.
Fermentadores	204 ± 84.1	230 ± 100.7	---
No fermentadores	89 ± 33.9	90.2 ± 34.7	103.6 ± 46
*p	0.0093	0.018	---
IC 95%	31.31 a 198	-10.9 a 231	---

* Obtenido mediante prueba t de Student
IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%.

4.2. DISCUSION.

Los bacteriemias son padecimientos infecciosos graves que frecuentemente ponen en peligro la vida de los pacientes, por lo que los hemocultivos, son de los exámenes más importantes que se realizan en un laboratorio de microbiología clínica. En el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" se procesaron en el período de seis meses 1516 hemocultivos, siendo este uno de los estudios microbiológicos más solicitados en el Instituto. La rapidez y especificidad en la detección de hemocultivos positivos son esenciales en el manejo oportuno y eficiente de los pacientes con este tipo de padecimientos.

Clásicamente se han utilizado únicamente métodos convencionales de hemocultivos, los cuales presentan como desventaja el tiempo necesario para detectar su positividad, ya que el subcultivo que requieren consume 18 a 24 hrs más (6).

Con la introducción de los sistemas automatizados, el tiempo requerido para determinar la positividad de un hemocultivo es más corto, siendo los sistemas Bactec de la casa comercial Becton Dickinson uno de los más utilizados. Estos sistemas ofrecen varias ventajas en las que se citan: la eliminación de agentes antimicrobianos de la sangre, la detección del crecimiento microbiano sin subcultivo y el manejo automatizado de varios frascos de hemocultivos.

Estos sistemas automatizados detectan niveles de concentración de CO₂ producido por el metabolismo de los microorganismos por radiometría, espectrofotometría infrarroja o fluorescencia (6,12,15).

Actualmente, muchos de los hospitales en México cuentan con un sistema espectrofotométrico infrarrojo (Bactec NR), que evita el uso de material radioactivo, algunos otros tienen ya un sistema de detección de producción de CO₂ por fluorometría. Sin embargo, los sistemas radiométrico y no radiométrico presentan con relativa frecuencia la

obtención de hemocultivos falsos positivos debido a una estimación inadecuada de los valores umbrales, a diferencia del sistema fluorométrico que determina la presencia de crecimiento con base en la curva de incremento de CO_2 .

En este y en otros estudios, se ha encontrado una frecuencia elevada de falsos positivos. Karen Brooks y cols. informaron un 43% de hemocultivos falsos positivos con el sistema radiométrico, utilizando el valor de umbral estipulado por la casa comercial (20 U); y al modificarlo (30 U) la frecuencia de falsos positivos disminuyó hasta 1.5% (5).

Con el sistema no radiométrico, Matlow y cols, realizaron un estudio similar, utilizando hemocultivos pediátricos informando un 84% de falsos positivos (18). Del mismo modo, McGowan y cols. informaron un 5.9% de falsos positivos utilizando el valor umbral estipulado de 35 U, al incrementarlo a 45 U, la frecuencia de falsos positivos se redujo al 2.3% (19). Por otro lado Courcol, informa de un 2.8% de falsos positivos, aunque en otros se cita mayor 18.5% (7).

En nuestra institución la frecuencia de falsos positivos encontrada fué de 13.8% a pesar de haber incrementado el valor umbral hasta 60 U .

Hasta el momento existe poca información sobre los posibles factores que influyen en la concentración de CO_2 detectada por estos sistemas y que pueden dar por resultado un valor de crecimiento elevado aún en ausencia de microorganismos, dando por resultado hemocultivos falsamente positivos. Se ha descrito únicamente que la concentración de pCO_2 y la cantidad de leucocitos en la sangre del paciente participan en forma directa (7,19,27).

En el presente estudio se encontró que la concentración de glucosa, de leucocitos y de pCO_2 , se encuentra en relación con la presencia de hemocultivos falsos positivos, es decir, que tienen valores de crecimiento elevados por lecturas altas de CO_2 . Esto difiere de lo

informado por Courcol y cols. quienes mencionan que solamente la concentración de $p\text{CO}_2$ puede afectar las lecturas de los valores de crecimiento dando resultados falsos positivos, informando hasta 5.4% de falsos positivos en pacientes con hipercapnia y 1.7% en pacientes con hipocapnia, lo cual se confirma en el presente estudio.

Por otro lado, Berger y Courcol informaron que no hay relación con la cantidad de leucocitos con la presencia de valores de crecimiento elevados; sin embargo, en el presente estudio al igual que en el de Barnatyne y cols. se encontró que esta relación si existe (3,7).

En lo que se refiere a la concentración de glucosa, es importante recordar que es una biomolécula determinante para la multiplicación de los microorganismos, porque mediante ella realiza su metabolismo energético. Así mismo, la glucosa sigue exactamente las mismas rutas metabólicas en la célula animal, con excepción de la vía de Entner Doudorouff que es característica de los microorganismos (13,26); lo que explica que en pacientes que presentan concentraciones elevadas de glucosa en sangre los hemocultivos falsos positivos se presentaran con mayor frecuencia que en pacientes con glucosa normal (RM 7.9 con IC 95% 2.7 a 23) ya que en estas vías metabólicas de la glucosa el producto final es CO_2 y agua.

En relación a los leucocitos polimorfonucleares durante el proceso de fagocitosis, estos presentan un aumento de la glucólisis y un flujo a través de la vía oxidativa del fosfogluconato y por otro lado los macrófagos presentan mayor metabolismo de la glucosa y una producción mayor de lactato, aumentando diez veces más la vía hexosamonofosfato, estas vías metabólicas, finalmente conducen también a la producción de CO_2 y agua (20,25,26).

La concentración de hemoglobina no mostró relación con la presencia de hemocultivos falsos positivos, esto muy probablemente se deba a que, como se ha

informado, la glucólisis en los glóbulos rojos muestra varios rasgos especiales como es, que la glucosa dentro de él, es convertida en ácido láctico a través de una serie de reacciones semejantes a las de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof; sin embargo, la glucosa no es oxidada hasta CO_2 (13).

El colesterol no influye como factor en la elevación del CO_2 celular, ya que éste es eliminado por las vías biliares, pero se incluyó en el estudio para eliminar datos estadísticos erróneos.

En relación la posible diferenciación del género de los microorganismos por el valor de crecimiento en el hemocultivo, el valor más elevado de los microorganismos aislados se presentó en el grupo de bacilos gramnegativos fermentadores (enterobacterias). Este valor referido se debe a que especialmente las enterobacterias pueden llevar a cabo una fermentación fórmica. En está, el metabolismo del piruvato conduce a cierto número de productos distintos, cuya naturaleza varía con cada microorganismo. Sin embargo, todos ellos producen formato que, o se acumula, o bien en ambiente ácido, se convierte por la acción de la fórmico hidrogenoliasa en H_2 y CO_2 (4,16,22).

Por otro lado, los bacilos gramnegativos no fermentadores son oxidativos de la glucosa, y eliminan productos por las vías de Entner-Duodoroff y el ciclo de Krebs que no son tan ácidos como los eliminados por los bacilos gramnegativos fermentadores que emplean la vía glucolítica; siendo el agua, el producto final del metabolismo oxidativo, la detección de la producción de CO_2 no solo tarda más sino que es en menor cantidad (16,21).

Estos valores de crecimiento y las diferencias encontradas entre los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores en este estudio puede ser de gran ayuda, permitiendo iniciar un tratamiento más orientado si mediante los valores de

crecimiento y la tinción de Gram se puede inferir que se trata de un microorganismo gramnegativo fermentador o no fermentador, debiendo cubrirse la posibilidad de pseudomonas, si en el gram se observan bacilos gramnegativos y el valor de crecimiento es relativamente bajo; esta observación esta sujeta a comprobación en estudios posteriores con un mayor número de hemocultivos positivos con bacilos gramnegativos, ya que en el presente estudio la muestra en relación a este grupo de microorganismos y en especial en relación a los no fermentadores fue relativamente pequeña.

En relación a los microorganismos grampositivos, los valores de crecimiento no permitieron su diferenciación entre estreptococos y estafilococos siendo estos muy similares a los de los bacilos gramnegativos fermentadores.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

- El sistema de hemocultivos automatizado Bactec NR 730, proporciona resultados con mayor rapidez que los sistemas convencionales.
- Es recomendable ajustar el valor umbral estipulado por la casa comercial, para disminuir los resultados falsos positivos.
- La determinación del valor umbral más conveniente en una institución depende del tipo de la población atendida.
- La frecuencia de falsos positivos encontrados en nuestro estudio fue de 13.8%.
- La glucosa elevada y la elevada concentración de leucocitos se encontraron en relación con la obtención de hemocultivos falsos positivos.
- El posible mecanismo por el cual la glucosa y la concentración de leucocitos infiere sobre el resultado del hemocultivo implica las vías metabólicas de los leucocitos y los productos del metabolismo de glucosa.

- En el caso de los cocos grampositivos, no fue posible determinar un perfil de producción de CO₂ dependiente del género de microorganismo aislado.
- En el caso de bacilos gramnegativos se puede diferenciar entre bacterias fermentadores y no fermentadores con un nivel confianza del 95% con base al valor de crecimiento, lo que puede ser de gran ayuda para el inicio de una terapia antimicrobiana empírica más adecuada.
- Es posible que existan otros posibles factores que aumentan la cantidad de CO₂ en los hemocultivos dando por resultado falsos positivos; se requerirán estudios posteriores para identificarlos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD and Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 5a. ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1991).
- 2.- Bartlett RC, Elnor PD, Washington JA, and Sherris JC., Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology blood cultures. American Society for Microbiology. Washington D.C. (1974).
- 3.- Berger SA, Dan M, Battat A, Kahn Y. Influence of patient hemogram on growth index values generated from radiometric detection device. J. Clin. Microbiol (1986); 23:203-204.
- 4.- Bernard DD, Dulbecco R, Microbiology, 2nd. edition. Harper and Row Publishers. San Francisco (1973).
- 5.- Brooks K and Soderman T. Rapid detection of bacteremia by a radiometric System., Am. J. Clin. Pathol 61:859-860.
- 6.- Calvin L, Strand MP and Jonas AS. Bloodstream infections laboratory detection clinical considerations. American Society of Clinical Pathologist. Chicago. (1988).
- 7.- Courcol RJ, Durocher AV, Robin H and Martin GR. Influence of blood carbon dioxide pressure on growth index values yielded by the BACTEC NR-660 sistem was evaluated. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.. (1989); 8(5): 400-401.
- 8.- Dalton HP, Kammer J, Allison MJ. Comparison of two blood culture sistems. Am. J. Clin. Pathol (1974); 61:856-858.
- 9.- De Blanc H, DeLand HF, Wagner H. Automated radiometric detection of bacteria in 2,967 blood culture. Appl Microbiol. (1971); 22: 846-849.
- 10.- Deland FH and Henry NW. Early detection of Bacterial growth, with carbon-14-labeled glucose. Radiology (1969); 92:154.
- 11.- Freeman BA. Microbiología de Burrows. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México. (1985)
- 12.- Finegold SM, Baron EJ, Bailey Scott. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. (1989).
- 13.- Harper HA. Manual de Química Fisiológica. 5a. edición. Editorial El Manual Moderno. México. (1976).

- 14.- Koneman EW, Stephen DA, Dowell VR, Herbert M.Sommers. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México. (1985).
- 15.- Larry GC and James JP. Influence of a blood culture inoculation technique on detection of bacteremia by the BACTEC Sistem. J. Clin. Microbiol., (1982);590-592.
- 16.- Mac Faddin Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana S.A. México. (1984).
- 17.- Manual de Operación y Mantenimiento. Becton Dickinson Sistemas de Instrumentos para Diagnóstico. BACTEC NR-730. Sept.(1990).
- 18.- Matlow AG, Cammack Sh, Taylor B, Burkholder B. Evaluation of manufacturer's recommended growth value thresholds for Bactec media. J. Clin. Microbiol. (1992); 30:2754-2755.
- 19.- MCGowan JE, and Metchock BG. Metchock Determination of growth value thresholds for BACTEC PLUS aerobic blood culture vials. J. Clin. Microbiol. (1992); 30(4):771-774.
- 20.- Park BH, Holmes B and Good R.A. Metabolic activities in leukocytes of newborn infants. J. Pediatrics. (1970); 76:237-241.
- 21.- Rose AH., Microbiología Química. Alhambra, España . (1977)
- 22.- Stainer R. The microbial world. Prentice Hall, Inc.
- 23.- Washington John A. Blood Cultures. Rev Infect Dis.(1986); 8(5):792-802.
- 24.- Weinstein MP, Stanley M, Michael LW, Lizzie JH, Stratton CW, and Borth RL., Controlled Evaluation of BACTEC PLUS and Roche Septi-Check aerobic blood culture Bottles., J. Clin. Microbiol., (1991); 29: 879-882.
- 25.- West J, Morton DJ, Esmann V, Stjernholm RL. Carbohydrate metabolism in leukocyte. VII Metabolic activities of the macrophage. Arch Biochim Biophys. (1968); 124: 85-90.
- 26.- While A, Philip H, Emill S. and Hill RL. Principios de Bioquímica., Editorial Mc Graw Hill. México (1993).
- 27.- Zwanum AA. Effect of osmotic stabilizers on CO₂ production by bacteria and blood. Applied Microbiol. (1973) 25:589-591.