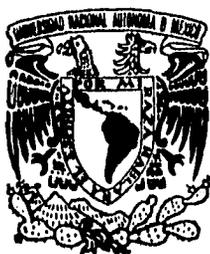


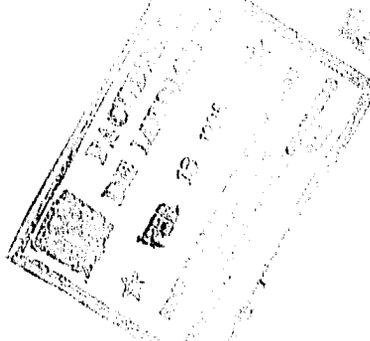
11227



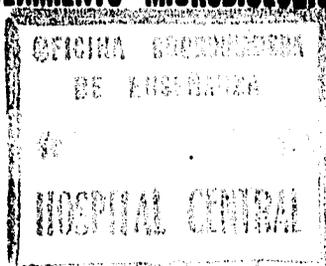
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**HOSPITAL CENTRAL NORTE
PETROLEOS MEXICANOS**

66
Lej



**COMPARACION DE DOS METODOS DIFERENTES PARA
AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO**



**TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN:
MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:
DRA. ADRIANA MARQUEZ GARCIA**



PEMEX

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

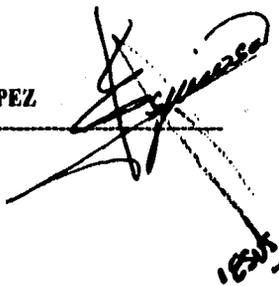
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

PETROLEOS MEXICANOS

HOSPITAL CENTRAL NORTE

PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DR. FERNANDO ROGELIO ESPINOSA LOPEZ
JEFE SERVICIO MEDICINA INTERNA

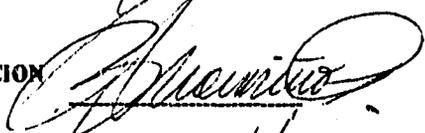


PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO
DR. JESUS DIAZ TORRES
DIRECTOR HOSPITAL CENTRAL NORTE

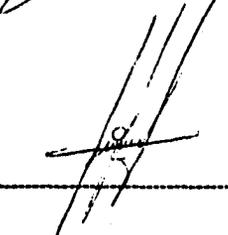
JEFE DE ENSEÑANZA
DR. FERNANDO ROMERO FERNANDEZ



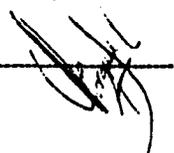
JEFE DEL DEPTO. DE INVESTIGACION
DRA. ROSA R. MOURIÑO PEREZ



ASESOR DE TESIS
DR. MARCO ANTONIO CRUZ PADRON
MEDICO INTERNISTA

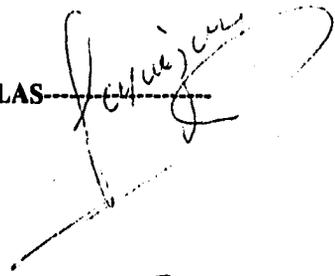


AUTOR
DRA. ADRIANA MARQUEZ GARCIA
RESIDENTE III AÑO MEDICINA INTERNA



COLABORADORES:

DR. CARLOS ARAIZA CASILLAS
JEFE DE LABORATORIO
HCN PEMEX

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Araiza Casillas', written over a horizontal dashed line.

Q.F.B. MA. LOURDES LARA VIVAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lourdes Lara Vivas', written over a horizontal dashed line.

INDICE

I. PRESENTACION

- 1. Título**
- 2. Asesores**
- 3. Indice**
- 4. Introducción**

II. TEXTO

- 1. Marco teórico**
- 2. Planteamiento del problema**
- 3. Justificación**
- 4. Objetivo**
- 5. Hipótesis**
- 6. Material y métodos**
 - 6.1 Tipo de estudio**
 - 6.2 Población estudiada**
 - 6.2.1 Universo**
 - 6.2.2 Muestra**
 - 6.3 Definición de variables**
 - 6.4 Procedimiento de recolección de información**
 - 6.5 Plan de manejo estadístico**
 - 6.5.1 Técnicas de descripción**
- 7. Resultados**
- 8. Discusión**
- 9. Conclusiones**
- 10. Bibliografía**

INTRODUCCION

La práctica de pruebas apropiadas frecuentemente puede establecer si existe una infección, su etiología y, en muchos casos, el medicamento con mayor probabilidad de lograr la curación.

Las situaciones clínicas pueden ser aquellas en las cuales el diagnóstico es obvio, pero la etiología está por determinarse (meningitis, neumonía, infección de vías urinarias, etc.), o en las que el diagnóstico es incierto, como en la fiebre inexplicable. Hay múltiples situaciones clínicas en las que el laboratorio de microbiología puede proporcionar información útil para establecer un diagnóstico y determinar el tratamiento. La mayor parte de estas situaciones comprende las enfermedades infecciosas. El laboratorio también puede dar datos valiosos para la vigilancia e investigación epidemiológica de infecciones nosocomiales.

La utilización eficaz del laboratorio de microbiología depende de tres principios fundamentales: obtener la muestra adecuada, proporcionar información clínica al laboratorio e interpretar los resultados de las pruebas.

El laboratorio puede usar dos procedimientos para comprobar una infección: directamente, mediante la demostración del propio microorganismo, o indirectamente, por la presencia de anticuerpos típicos del agente infeccioso y deducir en esta forma, que el microbio está o estaba presente.

Con cualquier procedimiento, es esencial obtener la muestra apropiada, proporcionar información clínica al laboratorio e interpretar correctamente los resultados de las pruebas.

Por lo tanto, es necesario realizar un estudio para determinar nuestra flora hospitalaria, la calidad de nuestros medios de cultivo y la sensibilidad microbiana a los antibióticos.

Consideramos que el presente trabajo es de interés, dado el desconocimiento actual de estos aspectos en nuestro medio.

MARCO TEORICO

La selección de la muestra apropiada está condicionada generalmente a lo que se ha llegado a conocer como la ley de Sutton. Se toman muestras del sitio anatómico o del órgano indicado por los signos y síntomas. En las situaciones en las cuales no puede obtenerse directamente una muestra de la lesión u órgano sospechoso, se toma de los líquidos corporales que drenan o circulan sobre los mismos. Cuando se obtienen muestras de sitios normalmente estériles, como sangre y tejidos, cualquier germen aislado es sospechoso de ser la causa de la infección. Si la zona de donde se obtiene el cultivo normalmente está habitada por microorganismos, entonces las especies patógenas potenciales se buscan dentro de la flora natural.

Uno de los problemas mayores en la obtención de cultivos representativos de zonas normalmente estériles, consiste en evitar la contaminación del ambiente y del propio paciente. Deben hacerse todos los esfuerzos posibles para conservar la muestra sin microorganismos naturales con el uso de técnicas asépticas y antisépticas.

A menos que el medio de cultivo sea sembrado junto a la cama, el transporte de la muestra al laboratorio requiere que se conserve en condiciones que garantice la viabilidad de los microorganismos, reduciendo al mínimo su proliferación.

La replicación del germen durante el transporte puede ser inconveniente en situaciones en las cuales la cuantificación es significativa (p.ej. en la orina) o cuando hay una proliferación exagerada de microorganismos naturales o contaminantes, el agente etiológico puede enmascarse o suprimirse. Cuando se considera la posibilidad de bacterias anaerobias, la muestra se

protege del oxígeno atmosférico. Algunas especies son afectadas adversamente por el enfriamiento, mientras que otras sobreviven mejor cuando se refrigeran. En algunos casos, pueden emplearse medios de transporte no nutritivos para mantener la viabilidad de los microorganismos.

Es esencial que la muestra esté acompañada de la información clínica pertinente. Específicamente, el personal del laboratorio debe ser notificado sobre la naturaleza de la muestra, cómo se obtuvo y cuál es el problema clínico. Cuando se sospecha la posibilidad de un microorganismo como *Legionella* u hongos, esto debe notificarse. Muchos microorganismos requieren medios de cultivo o ambientes especiales que no se emplean de forma regular.

No deben practicarse pruebas regulares en las especies que son uniformemente sensibles a los antibióticos, tampoco deben hacerse sobre microorganismos contaminantes obvios o especies naturales que se obtienen de sitios en donde habitan.

No es práctico ni útil estudiar bacterias aisladas contra todos los antibióticos disponibles. Los medicamentos que son utilizados regularmente en las pruebas son los más apropiados para el tratamiento de infecciones causadas por el microorganismo particular aislado.

No es necesario realizar pruebas para cada miembro de las clases de medicamentos. Aunque puede haber diferencias farmacológicas entre los componentes de una clase, la sensibilidad suele ser la misma que la de la clase representativa.

Las pruebas cualitativas *in vitro* se realizan comúnmente por difusión en disco. Después de 18 a 20 horas de incubación, se examinan las placas para buscar las zonas de inhibición alrededor de los discos. Se mide el diámetro de cada zona, considerándose el microorganismo "sensible" a un

medicamento cuando el diámetro excede un valor establecido, que varía para cada fármaco, y "resistente", cuando este diámetro es menor que ese valor (12,16,17).

Los métodos cuantitativos comprenden la determinación de la concentración inhibitoria mínima(MIC) o la concentración bactericida mínima (MBC), o ambas cosas, de un medicamento (5,7).

La determinación in vitro de la sensibilidad no refleja la situación en el sitio de la infección que establece la interacción entre el huésped, el microorganismo y el medicamento. Los malos resultados de las pruebas en la predicción de la sensibilidad sobre la terapéutica, puede deberse al surgimiento de resistencia al medicamento durante el tratamiento, contacto deficiente entre fármaco y microorganismo, antagonismo entre dos antimicrobianos, inactivación de las penicilinas por flora natural productora de betalactamasa, deterioro de los mecanismos normales de defensa del huésped o pruebas en un microorganismo distinto al agente etiológico. En algunas situaciones, la sensibilidad in vitro no se relaciona con la eficacia terapéutica (ej. *Salmonella typhi* y aminoglucósidos, enterococos y cefalosporinas), pero por razones que aún no se conocen.

La práctica de pruebas in vitro es mejor para evitar tratamiento con medicamentos que no van a dar buenos resultados, que para obtener éstos con los que podrían darlos (3,8).

El fracaso terapéutico es común en infecciones tratadas con antimicrobianos en los cuales se encuentra que el microorganismo infectante es resistente en las pruebas in vitro; el éxito terapéutico sólo es bueno, y no puede asegurarse en

pacientes tratados con medicamentos a los cuales el microorganismo es sensible.

Varias consideraciones intervienen en la selección del mejor antimicrobiano para tratar una infección. Estas incluyen:

1). Conocimiento de la susceptibilidad inherente in vitro del organismo infectante a los antimicrobianos apropiados.

2). Relación de la susceptibilidad de la cepa con la de otros miembros de la misma especie.

3). Propiedades farmacológicas, incluso toxicidad, unión de proteínas, distribución, adsorción y excreción, en particular en circunstancias de insuficiencia hepática o renal existente o en desarrollo.

4). Experiencia clínica previa de eficacia en el tratamiento de infecciones debidas a la misma especie.

5). Naturaleza del proceso patológico subyacente, su historia natural y su influencia sobre la quimioterapia y

6). Estado de inmunidad del huésped (2, 10).

El propósito de las pruebas de sensibilidad in vitro consiste en determinar la idoneidad de varios antimicrobianos para el tratamiento de una infección particular. La selección de un antibiótico requiere criterio médico y debe incluir la consideración de la actividad inhibidora y las características farmacológicas del fármaco. Aunque la sensibilidad in vitro del germen causal es de importancia primordial, también deben tomarse en consideración otros factores, entre ellos, la farmacocinesia del antimicrobiano (vía de administración, fijación a proteínas, concentraciones tisulares en el sitio de la infección y toxicidad), factores del huésped (alergia, funcionamiento renal) y el costo del medicamento (19, 20).

La capacidad de un laboratorio para discriminar pacientes con o sin enfermedad depende de la sensibilidad y especificidad

medicamento cuando el diámetro excede un valor establecido, que varía para cada fármaco, y "resistente", cuando este diámetro es menor que ese valor (12, 16, 17).

Los métodos cuantitativos comprenden la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) o la concentración bactericida mínima (MBC), o ambas cosas, de un medicamento (5, 7).

La determinación in vitro de la sensibilidad no refleja la situación en el sitio de la infección que establece la interacción entre el huésped, el microorganismo y el medicamento. Los malos resultados de las pruebas en la predicción de la sensibilidad sobre la terapéutica, puede deberse al surgimiento de resistencia al medicamento durante el tratamiento, contacto deficiente entre fármaco y microorganismo, antagonismo entre dos antimicrobianos, inactivación de las penicilinas por flora natural productora de betalactamasa, deterioro de los mecanismos normales de defensa del huésped o pruebas en un microorganismo distinto al agente etiológico. En algunas situaciones, la sensibilidad in vitro no se relaciona con la eficacia terapéutica (ej. *Salmonella typhi* y aminoglucósidos, enterococos y cefalosporinas), pero por razones que aún no se conocen.

La práctica de pruebas in vitro es mejor para evitar tratamiento con medicamentos que no van a dar buenos resultados, que para obtener éstos con los que podrían darlos (3, 8).

El fracaso terapéutico es común en infecciones tratadas con antimicrobianos en los cuales se encuentra que el microorganismo infectante es resistente en las pruebas in vitro; el éxito terapéutico sólo es bueno, y no puede asegurarse en

información al iniciarse el tratamiento, pero en muchas otras, la sospecha o el reconocimiento de la infección, conduce a lo que se conoce como terapéutica empírica. La palabra griega empírico no significa terapéutica basada en adivinación, sino más bien que se ha iniciado para inhibir o matar a los microorganismos patógenos que con mayor probabilidad provocan una enfermedad particular. La identificación del germen patógeno es crítica.

Al seleccionar un agente antimicrobiano terapéutico, es responsabilidad del médico tomar en consideración las características farmacológicas de diversas drogas, así como su relativa efectividad antimicrobiana. La responsabilidad del laboratorio es dar información obtenida de pruebas estandarizadas *in vitro*, sobre la actividad de agentes antimicrobianos apropiados contra el microorganismo en cuestión (2, 6, 19).

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad por dilución y difusión pueden estar bajo una influencia marcada de los reactivos y condiciones de las pruebas, y estas variables han provocado considerable confusión en épocas anteriores (11, 13).

La densidad del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación, el pH, la atmósfera y la estabilidad de los antimicrobianos pueden influir en los puntos finales obtenidos. Las diferencias de los componentes o del contenido iónico del medio, incluso entre uno y otro lote, pueden influir en los resultados de las pruebas, particularmente con sulfonamidas, tetraciclinas, polimixinas y aminoglucósidos. Además, las pruebas de difusión dependen de la velocidad de crecimiento del microorganismo y del tipo, la profundidad y la concentración del agar usado (21).

No puede exagerarse la necesidad de obtener material adecuado para practicar exámenes con tinciones de Gram y cultivos apropiados (1).

Por estas razones, se ha dado especial importancia a los procedimientos de referencia y a la estandarización metodológica, pues sólo así es posible obtener buena reproducibilidad en el trabajo de investigación y en la práctica clínica (10).

En cada una de las pruebas de susceptibilidad, el inóculo deriva de varias colonias, con el objeto de reducir la posibilidad de seleccionar variantes derivadas de mutaciones por pérdida o segregantes de marcadores de resistencia al factor R. También aumenta la posibilidad de incluir representantes del microorganismo más resistente, si está representada más de una cepa en colonias que no puedan distinguirse morfológicamente. Los inóculos finales son razonablemente abundantes, lo cual aumenta la posibilidad de detectar mutaciones de alta frecuencia a la resistencia y cepas heterorresistentes. Los medios seleccionados muestran generalmente buenas calidades de buffer y reproducibilidad, y tienen un pH fisiológico.

Un criterio central de las condiciones a emplear en las pruebas efectivas de difusión, dilución o automatizadas es que estas pruebas deben ser capaces de detectar cepas portadoras de determinantes de resistencia clínicamente importantes.

El diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas depende de la identificación del microorganismo en los diversos líquidos corporales que drenan o circulan sobre la lesión u órgano afectado, o en la sangre del paciente, si se trata de una bacteriemia durante enfermedades generales (neumonía, meningitis, infecciones cardiovasculares), o posterior a la manipulación por cateterización de ciertas regiones anatómicas.

En consecuencia, los hemocultivos constituyen un procedimiento extremadamente importante para la identificación del germen.

Las indicaciones de los hemocultivos son las infecciones intravasculares (sepsis, endocarditis) e infecciones con una fase bacteriémica (neumonía, meningitis, abscesos abdominales y pélvicos, osteomielitis, fiebre tifoidea, brucelosis, etc.).

SELECCION DE METODOS PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD.

La sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos puede determinarse mediante diversas pruebas (2). Las de sensibilidad microbiana sólo deben practicarse en cultivos puros, significando esto que no se tienen resultados de sensibilidad sino hasta 36-48 horas después de haberse obtenido la muestra inicial para el cultivo (22).

Las pruebas de sensibilidad microbiana deben estandarizarse cuidadosamente en relación al tamaño del inóculo, el medio de cultivo y el período de incubación (14, 15, 16).

El procedimiento más usado es el método de difusión con discos, que es fácil de realizar, de costo bajo y proporciona datos en un plazo de 18 a 24 horas, aunque en la actualidad, casi el 50% de los laboratorios clínicos realiza pruebas de dilución como procedimiento suplementario o método de rutina.

El método de difusión ha sido aceptado por la Food and Drug Administration (FDA) y aceptado como estándar por el

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (12).

Este procedimiento, tal como se emplea normalmente, es esencialmente una prueba cualitativa que ubica a los microorganismos en la categoría de sensibles (susceptibles), intermedios (moderadamente susceptibles) o resistentes.

Es un método común de sensibilidad microbiana, semicuantitativo, en el que se inocula la superficie de una placa de agar con un hisopo humedecido en una dilución del líquido de cultivo estandarizado.

El procedimiento es flexible en cuanto a los antimicrobianos que pueden probarse y es fácil hacer pruebas individuales en diferentes momentos.

Es técnicamente simple, aunque requiere gran atención a los detalles.

En la prueba de disco, se inocula la superficie de una placa de agar con un hisopo humedecido en una dilución del líquido de cultivo estandarizado. Se colocan discos de papel de tamaño estándar, que han sido impregnados con una concentración fija del antimicrobiano, sobre el "prado" de bacterias y se incuban las placas durante 18 a 24 horas a 37°C. La concentración del antibiótico en el disco ha sido seleccionada para proporcionar un diámetro de zona inhibida a su alrededor relacionada linealmente al logaritmo de la concentración inhibidora del medicamento según se mide con un método de dilución en tubo o agar. Se mide el diámetro de la zona sin proliferación alrededor del disco antibiótico. Los resultados del método de sensibilidad con disco suelen informarse con los términos de sensible, resistente e intermedio.

Es generalmente aplicable a los microorganismos cuyo ritmo de crecimiento se aproxima al de los miembros de la familia

Enterobacteriaceae y Staphylococcus spp. y enterococos, o sea los llamados de desarrollo rápido, y el procedimiento se ha adaptado a para detectar cepas productoras de penicilinas de Haemophilus influenzae y Neisseria gonorrhoeae, y cepas de neumococos que han desarrollado mayor resistencia a la penicilina y algunos antibióticos más.

Las deficiencias de la prueba son su interpretación no cuantitativa, su inaplicabilidad en muchos microorganismos de crecimiento lento y su inexactitud para predecir la susceptibilidad (no la resistencia) a los antimicrobianos, como las polimixinas, que se difunden mal. Además, no se ha estandarizado en forma adecuada en lo referente a bacterias anaerobias.

En conjunto, pese a todo, es un procedimiento eficaz para casi todas las pruebas de rutina, pero requiere el suplemento de una prueba de dilución en situaciones en que es inaplicable o cuando se necesitan resultados más cuantitativos.

Los datos cuantitativos sobre la sensibilidad de los microorganismos pueden determinarse mediante las técnicas de microdilución en caldo o en agar (2, 9), que detectan la concentración más baja del antimicrobiano que previene una proliferación visible después de una incubación de 18 a 24 horas. Esta concentración se conoce como concentración mínima inhibidora (MIC). El agar o el caldo contienen antibióticos en diluciones seriadas al doble que cubren las concentraciones que podrían alcanzarse en el ser humano. Para comprender los valores MIC es necesario entender la farmacocinesia de un antimicrobiano. En general, se ha considerado que un microorganismo es sensible cuando la MIC es cuando menos una cuarta parte de la concentración sérica máxima que se obtiene fácilmente con el antimicrobiano. Con el

método de microdilución o la prueba de dilución en tubo, es posible determinar la concentración bactericida mínima (MBC) o la concentración letal mínima.

El método de microdilución por sistema mecanizado automatizado es el método más cuantitativo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, derivado de las recomendaciones del International Collaborative Study o de las normas propuestas por NCCLS. Da resultados cualitativos directos, no está bajo la influencia de la velocidad de crecimiento del microorganismo y evita algunas complejidades de las propiedades de difusión de los antimicrobianos.

El sistema es también capaz de identificar *Neisseria* sp. y analizar muestras para detectar la presencia de micobacterias en aproximadamente el 50% del tiempo requerido por los métodos convencionales.

Las pruebas de dilución no tienen la flexibilidad de la prueba de difusión, generalmente no pueden usarse para pruebas directas de material clínico por la dificultad de detectar la contaminación y, si se expresan cuantitativamente, es necesario que el clínico pueda interpretar el resultado.

Si las pruebas de dilución no son el método de rutina, su primera indicación es obtener datos cuantitativos de susceptibilidad cuando éstos son importantes o necesarios para el buen tratamiento con terapia antimicrobiana (18).

Muchos laboratorios utilizan un compuesto particular como representativo de la clase de un grupo de compuestos. El que se encuentra en la difusión del disco o en el sistema de dilución en caldo se usa para representar la sensibilidad a cuatro o cinco medicamentos que tienen propiedades microbiológicas similares.

Es importante reconocer el hecho de que las pruebas de sensibilidad requieren interpretación. Es posible que ciertos microorganismos, como Staphylococcus aureus resistentes a la metilicina, aparezcan como sensibles a los antibióticos del grupo de las cefalosporinas, pero no son erradicados por estos medicamentos. Las pruebas de sensibilidad tampoco identifican una subpoblación resistente. Esto puede ser muy importante cuando la resistencia de un antimicrobiano es causada por una enzima que es reprimida normalmente en ausencia de dicho antimicrobiano.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ante el desarrollo constante de las investigaciones en el área de los antibióticos, surgen las siguientes preguntas, como una necesidad básica para cualquier centro hospitalario:

- a). ¿Cuáles son los principales microorganismos que conforman nuestra flora hospitalaria?
- b). ¿Cuál es la sensibilidad de éstos microorganismos a los diferentes antimicrobianos existentes en la actualidad?

3. JUSTIFICACION

Consideramos que es importante para toda institución médica el conocimiento tanto de su flora microbiológica, como la sensibilidad de ésta a los antibióticos de uso actual, ya que esto permite sospechar en la mayoría de los casos de infecciones intrahospitalarias, el posible agente etiológico y así poder iniciar una terapéutica empírica orientada a las características específicas de nuestro medio. Por consiguiente, es preciso realizar un estudio que nos aporte tal información, la cual será de beneficio para todos los servicios que integran este hospital y que deberá revisarse anualmente para detectar modificaciones en la población bacteriológica.

4. OBJETIVO

- 1. Comparar la eficacia del método de microdilución para el aislamiento microbiológico con los métodos de cultivo habituales.**
- 2. Identificar la distribución de los gérmenes más frecuentemente aislados en los diferentes líquidos corporales en nuestro hospital.**
- 3. Identificar la sensibilidad de los gérmenes más frecuentemente aislados, a los antibióticos usuales.**

5. HIPOTESIS

El método de microdilución es más rápido para el aislamiento microbiológico de los distintos líquidos corporales, comparado con los métodos de cultivo habituales.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio prospectivo, comparativo, transversal y observacional.

6.2. POBLACION ESTUDIADA

6.2.1 UNIVERSO

Se incluyeron en el estudio las diferentes muestras de los diferentes líquidos corporales, enviadas al laboratorio, de los pacientes derechohabientes del Hospital Central Norte de Pemex, durante un lapso de seis meses.

Recursos humanos: médico internista, químicos clínicos.

Recursos materiales: instalaciones y equipo de la Unidad de Bacteriología del laboratorio del HCN Pemex.

Recursos financieros: financiamiento por el propio hospital.

6.2.2 MUESTRA

Se obtuvo sangre por punción venosa después de preparar escrupulosamente el sitio de la piel. En adultos, se extraen de 18-20 ml. de sangre, distribuyendo 8 ml. en cada frasco para aerobios y anaerobios con 30-50 ml. de caldo enriquecido y CO₂ al 10%, conteniendo anticoagulante no tóxico y 2 ml. para el tubo de Vacutainer.

Dichas muestras fueron procesadas por ambos métodos bacteriológicos.

Método de microdilución: Se utilizó equipo BACTEC NR730 el cual se fundamenta en la generación de 14C0₂ a partir de sustratos que contienen 14C a fin de detectar microorganismos en líquidos orgánicos normalmente estériles, como la sangre.

Las muestras se introducen en ampollas aerobias y anaerobias que contienen sustratos marcados con 14C. Las

ampollas se incubaron, con monitoreo periódico para la detección del metabolismo microbiano, investigando la presencia de $^{14}\text{CO}_2$ en la parte superior de la ampolla.

La cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ presente se convierte en un índice de desarrollo que debe exceder una línea de base establecida para una lectura positiva.

Las ampollas de cultivo fueron subcultivadas, disponiéndose de instrumentos totalmente automatizados, utilizándose en este caso equipo VITEK mediante el cual se aisló el germen causal y se determinó la sensibilidad microbiana del mismo (12).

En el caso del cultivo mediante la técnica tradicional se sembró y vigiló el desarrollo bacteriano y cuando se consideró necesario, se realizó la resiembra correspondiente.

Los 3 frascos de cada hemocultivo (aerobios, anaerobios y Vacutainer), se incubaron en el laboratorio y se vigilaron para observar la proliferación, por inspección visual o subcultivo.

Se analizaron los reportes microbiológicos de los líquidos corporales para determinar la flora predominante en nuestros pacientes.

6.3 DEFINICION DE VARIABLES

Aislamiento microbiológico: es la recuperación del agente infeccioso de los diferentes líquidos corporales, a través de diferentes métodos existentes para ello.

Pruebas de sensibilidad microbiana: Se utilizan para la selección de los agentes terapéuticos más efectivos mediante la realización de técnicas in vitro.

6.4 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE INFORMACION.

Se recabaron los resultados, los cuales se anexaron en una hoja de recolección de datos y fueron analizados al final del estudio.

6.5 PLAN DE MANEJO ESTADISTICO

6.5.1 TECNICAS DE DESCRIPCION

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud de ambos métodos. Índice de concordancia de kappa. Tasas para la descripción de la frecuencia de presentación de cada germen.

7. RESULTADOS

REPORTE MICROBIOLÓGICO

Se obtuvo el reporte microbiológico en 30 muestras de hemocultivo, de los cuales 16 fueron positivos por el método I y 9 por el método II, obteniéndose un índice de kappa de 0.63.

El germen aislado fué el mismo por ambos métodos, sin embargo en 7 casos, positivos por el método I, no hubo desarrollo a las 168 horas por el método II.

Con el método I, se aisló el germen con mayor rapidez, con un rango de tiempo de 12-120 horas. Con el método II, el aislamiento se efectuó dentro de las 48-168 horas.

El método I se aceptó como el estándar ideal. Comparado con éste, el método II mostró una sensibilidad de 56%, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo del 100%, un valor predictivo negativo de 66% y una exactitud del 76%.

FLORA HOSPITALARIA

De los líquidos corporales cultivados para determinar la flora hospitalaria, 54 muestras de hemocultivos reportaron con mayor frecuencia: *E. coli* 13 casos (24%), *Estafilococo aureus* 12 (22%), *Estafilococo epidermidis* 6 (11%), *Pseudomona aeruginosa* 4 (7%), *Streptococo* del grupo D 4 (7%), y otros gérmenes menos frecuentes, que se muestran en la Tabla I.

En 50 muestras de urocultivo, los gérmenes aislados con mayor frecuencia fueron: *Escherichia coli* 25 casos (50%), *Klebsiella pneumoniae* 11 (22%), *Proteus mirabilis* 7 (14%), *Candida albicans* 4 (8%), *Estafilococo aureus* 3 (6%). Tabla II.

En 33 muestras de cultivo de líquido peritoneal, la flora aislada fué: *Estafilococo aureus* 13 casos (39%), *Estafilococo epidermidis* 5 (15%), *Escherichia coli* 3 (9%), *Streptococo* grupo D 3 (9%), *Pseudomona aeruginosa* 2 (6%) y otros menos frecuentes, que son mostrados en la Tabla III.

En 5 muestras de mielocultivo, el reporte microbiológico fué: *Estafilococo epidermidis* 2 casos (40%), *Estafilococo auricularis* 1 (20%), *Salmonella typhi* 1 (20%), *Criptococo neoformans* 1 (20%), como se observa en la Tabla IV.

En 6 cultivos de líquido cefalorraquídeo (LCR), se reportan: *Estafilococo aureus* 2 casos (33%), *Escherichia coli* 2 (33%), *Estafilococo epidermidis* 1 (16.6%), *Enterococo avium* 1 (16.6%). Tabla V.

En 2 cultivos de líquido sinovial, se aisló *Estafilococo haemolyticus* 1 caso (50%), *Estafilococo epidermidis* 1 (50%).

SENSIBILIDAD MICROBIANA

Los gérmenes más representativos aislados en hemocultivo fueron Escherichia coli y Estafilococo aureus.

Del primero, se observó resistencia a ampicilina en un 42% de los casos, a quinolonas en un 14% (ciprofloxacina, norfloxacina), a trimetropim/sulfametoxazol en un 14%, siendo susceptible a aminoglucósidos (amikacina, gentamicina) en un 100%, a otras quinolonas (pefloxacina), cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima, ceftazidima) y carbapenémicos (imipenem).

Del segundo, se reportó resistencia a oxacilina en un 14% de los casos y ciprofloxacina en un 28%, siendo la vancomicina el fármaco al que mostró mayor sensibilidad.

El germen más comúnmente aislado en urocultivo fué E. coli, que se mostró resistente a ampicilina (80% de los casos), ampicilina/sulbactam (60%), TMT/SMX (40 %), ciprofloxacina (40%), norfloxacina (40%), tobramicina (20%). Fué susceptible a aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), a algunas quinolonas (pefloxacina) y a cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima).

8. DISCUSION

La sospecha clínica temprana, las medidas diagnósticas rigurosas, la iniciación agresiva del tratamiento antimicrobiano apropiado, las medidas de sostén y las medidas dirigidas a revertir las causas predisponentes, son las piedras fundamentales del tratamiento exitoso.

Es obvio que la sospecha clínica de bacteriemia debe ser confirmada rápidamente por la identificación y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos productores de la enfermedad.

En la mayoría de los hospitales se ha vuelto una practica común utilizar los sistemas de cultivo disponibles comercialmente para el crecimiento bacteriano aerobio y anaerobio.

En los pacientes no tratados en los que finalmente se demuestra que están bacteriémicos, el primer grupo de hemocultivos que se toma será positivo más de 75% de las veces y el índice acumulativo de positividad para el tercer grupo de hemocultivos se aproxima al 98%.

El análisis reciente del intervalo de tiempo hasta la positividad de los hemocultivos indica que para la mayoría de los bacilos gramnegativos, el crecimiento de los microorganismos en los frascos de hemocultivos o en subcultivos se pone de manifiesto habitualmente hacia las 72 horas de incubación. El empleo de técnicas recientes puede incluso dar resultados más rápidos.

Por lo tanto, tres grupos de hemocultivos y tres días de observación cuidadosa han sido suficientes para documentar la

bacteriemia por gramnegativos en más de 90% de los pacientes previamente no tratados.

Todavía se recomienda la observación de signos de crecimiento en los frascos de hemocultivo por los métodos tradicionales durante períodos de hasta 7-10 días para la detección de microorganismos de crecimiento más tardío ó si el paciente estaba recibiendo antimicrobianos cuando se obtuvo el material para cultivo.

Debido a la aparición de bacteriemia polimicrobiana en un número importante de casos, la técnica de subcultivo también permite la identificación de variantes de los tipos bacterianos (dos tipos de la misma especie como *E. coli*), así como cultivos mixtos antes de que exista sobrecrecimiento por algún componente predominante.

En el presente trabajo se pone de manifiesto la superioridad del método I comparado con los medios de cultivo habituales, dada la rapidez con que reporta el germen aislado, además de su sensibilidad, especificidad, valores predictivos y exactitud cercanos al 100%, que lo coloca como el estándar ideal en cuanto a pruebas diagnósticas bacteriológicas se refiere, constituyéndose en un procedimiento de mayor utilidad, ya que evitará el retraso del inicio de la terapia definitiva, siendo aconsejable que se cuente con este equipo y técnicas en cualquier centro hospitalario de segundo y tercer niveles.

Las infecciones bacteriémicas producidas por bacilos gramnegativos siguen siendo uno de los mayores problemas, si no el principal, en los centros hospitalarios.

En nuestro estudio se observó que la *Escherichia coli* es el patógeno más común, como ya se ha reportado en la literatura.

El tracto gastrointestinal es el reservorio obvio de bacilos gramnegativos, aunque existen muchas otras fuentes de infección.

No es sorprendente que la *E. coli* sea muchas veces el microorganismo aerobio más común aislado en los hemocultivos.

La bacteriemia transitoria por bacilos gramnegativos es un hecho bien documentado, particularmente con la manipulación del tracto urinario, y ésta explica algunos casos en que pacientes bacteriémicos han sido "curados" con antibióticos inadecuados o sin tratamiento antimicrobiano.

La mayor parte de las *E. coli* aisladas de personas sanas suelen ser susceptibles a los agentes antimicrobianos utilizados más comúnmente.

En nuestro trabajo se observó que los microorganismos aislados de pacientes hospitalizados tuvieron una mayor proporción de cepas resistentes a uno o más agentes antimicrobianos, predominantemente a ampicilina. Este hecho ya se ha descrito en algunas publicaciones, tanto en gérmenes aislados de pacientes hospitalizados, como en los que ya han recibido tratamiento antimicrobiano previo.

Los agentes antimicrobianos ejercen fuertes presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas y favorecen a aquellos microorganismos que son capaces de resistirlos.

La variabilidad genética puede producirse por diversos mecanismos. Un proceso, denominado cambio microevolutivo, consiste en la mutación puntual de un par de bases de un nucleótido. Estas mutaciones pueden alterar el sitio de ataque de un antimicrobiano, interfiriendo así con su actividad. Un segundo nivel de variabilidad genómica observado en las bacterias se denomina cambio macroevolutivo y produce un

reordenamiento de segmentos de DNA en gran escala en un solo proceso. Estos reordenamientos incluyen inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposiciones de largas secuencias de DNA de una a otra ubicación en el cromosoma. Estos reordenamientos son originados por transposones o secuencias de inserción que tienen la capacidad de trasladarse en forma independiente del resto del cromosoma bacteriano. Un tercer nivel de variabilidad genética en las bacterias se origina en la adquisición de DNA extraño transportado por plásmidos, bacteriófagos o elementos genéticos de transposición. Estos mecanismos otorgan a las bacterias la capacidad aparentemente ilimitada de desarrollar resistencia a cualquier agente antimicrobiano. Una vez que evoluciona un gen de resistencia a un antibiótico, este determinante de resistencia puede diseminarse a otras bacterias por transformación, transducción, conjugación o transposición. Entonces, los clones favorecidos pueden proliferar en la flora de los pacientes expuestos a los antibióticos.

De los siete mecanismos diferentes de resistencia a los antibióticos, se ha observado inhibición enzimática por producción de betalactamasas mediadas por plásmidos, que inactivan a los antibióticos betalactámicos rompiendo la unión amida del ciclo; la enzima de clase C es codificada por un gen cromosómico de *E. coli*.

Las bacterias gramnegativas producen una variedad mucho mayor de betalactamasas que las grampositivas. Las betalactamasas son constitutivas y se agrupan en tres clases: las que hidrolizan la bencilpenicilina y cefaloridina o enzimas de amplio espectro, las oxacilinasas y las carbecilinasas.

Se ha observado la resistencia de las cepas de *E. coli* productoras de betalactamasa TEM-1 frente a la ampicilina.

La elevada prevalencia de la resistencia a las sulfonamidas entre bacterias gramnegativas puede atribuirse a la diseminación de plásmidos R que llevan genes que producen enzimas resistentes. El mecanismo de resistencia a la trimetoprima se produce en forma similar.

Entre las bacterias grampositivas los estafilococos son los patógenos más importantes productores de betalactamasa, que hidroliza con preferencia las penicilinas.

Otro mecanismo de resistencia es la alteración en las membranas bacterianas, tanto en la permeabilidad externa como en la interna. En *E. coli* se ha demostrado resistencia al cloramfenicol mediada por plásmidos debido a la disminución de la permeabilidad. Se han descrito mutantes resistentes con sistemas de transporte de electrones deficientes en especies de *E. coli* y *Estafilococo aureus*.

Otro mecanismo principal de resistencia en microorganismos gramnegativos es el resultado de una menor acumulación del antibiótico. Recientemente se ha demostrado en *E. coli* un sistema activo de flujo para la eliminación de fluoroquinolonas. Esto puede constituir un posible mecanismo de resistencia a los nuevos agentes derivados de las quinolonas. (23,24).

9. CONCLUSIONES

En nuestro estudio se observó que el método bacteriológico actual (método I) fué más eficaz que el método de cultivo habitual, obteniéndose el reporte microbiológico con mayor rapidez y confiabilidad, por lo que se le consideró como el estándar ideal como prueba diagnóstica.

La flora hospitalaria más comúnmente aislada estuvo constituida por Escherichia coli y Estafilococo aureus.

Del primer gérmen, se observó resistencia a ampicilina en gran proporción de los casos y del segundo, algunas cepas fueron resistentes a oxacilina.

Se concluye que el empleo de esta técnica actual en los centros hospitalarios será determinante para el inicio temprano de un tratamiento específico.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

10. BIBLIOGRAFIA

1. Appelbaum, P.C., R.B. Lawrence. 1979. *Comparison of three methods for anaerobe identification*. J.Clin. Microbiol.18:614-621.
2. Barry, A.L. 1976. *The antimicrobial susceptibility test: principles and practices*. Lea & Febiger, Philadelphia.
3. Courcol R.J., Fruchart A., Delvallez M.R., Martin G.R.1986. *Routine Evaluation of the Nonradiometric BACTEC NR 660 System*. J.Clin.Microbiol. 24(1):26-29
4. Damato, J.J., M.T. Collins, M.V.Rothlauf. 1983. *Detección of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures*. J Clin. Microbiol.17:1066-1073.
5. Eller PD, Neu HC.1981. *The inhibitory quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data*. JAMA 246:1575-1578.
6. Garrod, L.P., H.P. Lambert, F O'Grady. 1981. *Antibiotic and chemotherapy*.5th ed. Churchill Livingstone Ltd., Edinburgh.
7. Griffin M.R., Miller A.D., Davis A.C. 1982. *Blood culture cross contamination associated with a radiometric analyzer*. J. Clin. Microbiol. 15:567-570.
8. Haynes R.B. 1981. *How to read clinical journals: II. To learn about a diagnostic test*. Can Med Assoc J. 124:555-558.
9. Ilstrup D.M., Washington II J.A.. 1983. *The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia*. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 1:107-110.
10. Jones, R.N. 1983. *Antimicrobial susceptibility testing (AST): a review of changing trends, quality control guidelines, test accuracy, and recommendations for testing of b-lactam drugs*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1:1-24.

11. Jungkind D, Millán J., Allen S., Dyke J., Hill E. 1986. *Clinical Comparison of a New Automated Infrared Blood Culture System with the BACTEC 460 System*. J.Clin.Microbiol. 23 (2):262-266.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1982. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M2-T3*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
13. Neu HC: 1978. *What should the clinician expect from the microbiology laboratory?*. Ann Inter Med 89:781-784.
14. Plorde J.J., Tenover F.C., Carlson L.G. 1985. *Specimen volume versus yield in the BACTEC blood culture system*. J. Clin. Microbiol. 22:292-295.
15. Renner E.D., Gatheridge L.A., Washington II J.A. 1973. *Evaluation of radiometric system for detecting bacteremia*. Appl. Microbiol. 26:368-372.
16. Rodríguez F, Lorian V. 1985. *Antibacterial activity in blood cultures*. J.Clin. Microbiol. 21:262-263.
17. Rosenblatt Jon E. 1991. *Laboratory Tests To Guide Antimicrobial Therapy*. Mayo Clin Proc. 66:942-948.
18. Sahm, D.F., C.N. Baker, R.N. Jones 1983. *Medium-dependent zone size discrepancies associated with susceptibility testing of group D streptococci against various cephalosporins*. J. Clin. Microbiol. 18:858-865.
19. Schoenkecht, F.D., J.C. Sherris. 1980. *Recent trends in antimicrobial susceptibility testing*. Lab. Med. 11:824-832.
20. Schwartz JS. 1987. *Understanding laboratory test results. Conditions for appropriate use laboratory tests*. Med Clin North Am. 71:639-652.
21. Tenney J.H., Reller L.B., Mirrett S., Wang W.L.L., Weinstein M.P. 1982. *Controlled evaluation of the volume of*

blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. J Clin. Microbiol. 15:558-561.

22. Tilton R.C. 1982. *The laboratory approach to the detection of bacteremia. Annu. Rev. Microbiol.* 36:467-493.

23. Waxman DJ, Strominger JL. 1983. *Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. Annu Rev Biochem.* 52:825-39.

24. Yoshimura f, Nikaido H. 1985. *Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of Escherichia coli K-12. Antimicrob Agents Chemoter.* 27:84-92.

FLORA HOSPITALARIA

HEMOCULTIVOS

54 MUESTRAS

| GERMEN | FRECUENCIA |
|-----------------|------------|
| E. coli | 13 |
| E. aureus | 12 |
| E. epidermidis | 6 |
| P. aeruginosa | 4 |
| E. gpo. D | 4 |
| E. cloacae | 2 |
| Cl.perfringes | 2 |
| E. auricularis | 2 |
| S. typhi | 1 |
| Kl.pneumoniae | 1 |
| E. viridans | 1 |
| E. simulans | 1 |
| E. faecalis | 1 |
| Campylobacter | 1 |
| Morganella m. | 1 |
| Criptococo neo. | 1 |

TABLA I

FLORA HOSPITALARIA

UROCULTIVOS

50 MUESTRAS

| GERMEN | FRECUENCIA |
|---------------|-------------------|
| E. coli | 25 |
| Klebsiella | 11 |
| Proteus | 7 |
| Candida alb. | 4 |
| E. aureus | 3 |

TABLA II.

FLORA HOSPITALARIA

LIQ.PERITONEAL

33 MUESTRAS

| GERMEN | FRECUENCIA |
|------------------|------------|
| E. aureus | 13 |
| E. epidermidis | 5 |
| E. coli | 3 |
| Estrep.gpo.D | 3 |
| Pseudomona a. | 2 |
| Candida | 2 |
| Klebsiella pn. | 1 |
| Enterobacter cl. | 1 |
| Serratia marc. | 1 |
| Citrobacter | 1 |
| Moraxella sp | 1 |

TABLA III
PACIENTES EN PROGRAMA DE DIP

FLORA HOSPITALARIA

MIELOCULTIVO

5 MUESTRAS

| <u>GERMEN</u> | <u>FRECUENCIA</u> |
|-----------------|-------------------|
| E. epidermidis | 2 |
| E. auricularis | 1 |
| S. typhi | 1 |
| Criptococo neo. | 1 |

TABLA IV

FLORA HOSPITALARIA

MIELOCULTIVO

5 MUESTRAS

| <u>GERMEN</u> | <u>FRECUENCIA</u> |
|-----------------|-------------------|
| E. epidermidis | 2 |
| E. auricularis | 1 |
| S. typhi | 1 |
| Criptococo neo. | 1 |

TABLA IV

FLORA HOSPITALARIA

CULTIVO LCR

6 MUESTRAS

| <u>GERMEN</u> | <u>FRECUENCIA</u> |
|----------------|-------------------|
| E. aureus | 2 |
| E. coli | 2 |
| E. epidermidis | 1 |
| Enterococo av. | 1 |

TABLA V

FLORA HOSPITALARIA

CULTIVO LIQ.SINOVIAL

2 MUESTRAS

| <u>GERMEN</u> | <u>FRECUENCIA</u> |
|----------------|-------------------|
| E.haemolyticus | 1 |
| E.epidermidis | 1 |

TABLA VI

REPORTE MICROBIOLÓGICO

COMPARACION DE DOS METODOS

30 MUESTRAS

| GERMEN | METODO I | METODO II |
|--------------|----------|---------------|
| E. coli | 24 h | 72 h |
| E. coli | 36 h | s/d 168h (7d) |
| E. coli | 12 h | 48 hr |
| E. coli | 12 h | s/d 168h (7d) |
| E. coli | 36 h | s/d 168h (7d) |
| E. coli | 12 h | s/d 168h (7d) |
| E. aureus | 24 h | 144 h |
| E. aureus | 120 h | s/d 168h (7d) |
| E. aureus | 72 h | s/d 168h (7d) |
| E. aureus | 24 h | 48 h |
| S. typhi | 36 h | 48 h |
| S. typhi | 12 h | 36 h |
| S. typhi | 24 h | 72 h |
| Candida alb. | 72 h | s/d 168h (7d) |
| Candida alb. | 72 h | 120 h |
| E. viridans | 36 h | 120 h |

HEMOCULTIVO