



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Implementación de una nueva estrategia para la
identificación de microorganismos en hemocultivos positivos
y otros líquidos corporales”**

TESIS

**Que para obtener el título de
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

PRESENTA

Ana Karen Guadalupe Jiménez Ramírez

ASESORAS:

QFB Reyna Flores Cima

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Edo. De México 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Tesis y Examen Profesional

Implementación de una nueva estrategia para la identificación de microorganismos en hemocultivos y otros líquidos corporales.

Que presenta la pasante: Ana Karen Guadalupe Jiménez Ramírez
Con número de cuenta: 307070654 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Diciembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Dedicatorias

A mi padre, por ser el pilar de mi vida y una de mis más grandes motivaciones, por hacer todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, cada logro mío es un logro tuyo. Te quiero papá.

A mi hijo Alain, mi mayor éxito y triunfo, por darme las fuerzas que necesito para seguir día a día, por ser mi mayor motivación y mi más grande amor, donde quiera que te encuentres esto es para ti, te amo mi niño.

A mi madre, por estar para mí y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, esto también es para ti.

Agradecimientos

En primer lugar a mi padre, gracias por cada uno de los sacrificios realizados para que yo este culminando esta etapa de mi vida. Gracias por tanto papá.

Gracias Alain, mi más grande ilusión, me diste motivos para no detenerme, le diste sentido a mi vida y eres mis ganas de no fallar jamás, gracias por llegar a mi vida, gracias por regalarme tu presencia, siempre te amare.

Gracias a las mujeres de mi vida, mi madre, mi hermana y mi abuela fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida, en los momentos gratos y más aún en mis momentos amargos, gracias por ser parte de mi vida.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, institución a la que orgullosamente pertenezco desde el nivel bachillerato y en la cual adquirí los conocimientos que hoy me permiten presentar este trabajo.

Agradezco sinceramente a mi asesora de Tesis, la M. en C. Ana Laura Vázquez, por su dedicación, sus conocimientos, paciencia, motivación y apoyo fueron fundamentales para la realización de este trabajo, tiene mi admiración, gracias por todo lo recibido.

Mi agradecimiento también va dirigido a la Química Reyna Flores, Jefa del laboratorio central del área de bacteriología de la unidad médica de alta especialidad Hospital de especialidades del Complejo CMN Siglo XXI, por haber aceptado que realizara mi tesis dentro de su laboratorio, además del apoyo brindado durante la realización del trabajo.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que compartieron conmigo este proceso de formación profesional, por hacer más ameno el camino y por sus palabras de aliento.

Índice

Capítulo 1. Introducción	5
1.1 Bacteriemia y fungemia	5
1.2 Generalidades de bacterias.....	6
1.2.1 Gram Positivas y Gram Negativas.....	8
1.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
1.2.5 <i>Escherichia coli</i>	13
1.2.6 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
1.2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.3 Generalidades de levaduras.....	17
1.4 Sangre y líquidos diversos.....	18
1.4.1 Sangre	19
1.4.2 Líquido cefalorraquídeo (LCR).....	20
1.4.3 Líquido Peritoneal	21
1.5 Hemocultivo	22
1.6 Principales microorganismos presentes en hemocultivo	24
1.7 Sistemas automatizados de detección e identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana	26
1.8 Sistema de detección bacteriana “VersaTrek”	29
1.9 Sistema de identificación y sensibilidad bacteriana “Vitek 2”	32
1.10 Sensibilidad Bacteriana.....	40
Capítulo 2. Justificación	41
2.1 Hipótesis	41
2.2 Objetivos General.....	41
2.3 Objetivos Particulares	42
Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	42
Capítulo 4. Resultados.....	46
Capítulo 5. Discusión de Resultados	62
Capítulo 6. Conclusiones	66
Capítulo 7. Referencias.....	67

Capítulo 1. Introducción

1.1 Bacteriemia y fungemia

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre, el término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre. Ambas son complicaciones graves de muy variadas infecciones bacterianas y fúngicas.

Ambas patologías son ocasionadas por una variedad de etiologías, influidas por numerosos factores de riesgo que la favorecen, unos de índole intrínseca correspondientes al hospedero y otros, extrínsecos o ambientales. Las múltiples combinaciones de estos tres elementos, etiología, factores de riesgo y pacientes, explica la variedad de manifestaciones clínicas de la bacteriemia y fungemia así como las grandes diferencias pronosticas.

La entrada al torrente circulatorio de una bacteria o de un hongo se produce casi siempre a partir de una infección focal, que puede estar localizada en la piel, en el pulmón, en el tubo digestivo o en otro lugar que constituye la puerta de entrada. Los catéteres y otros instrumentos intravasculares colonizados también son un foco de sepsis frecuente. La bacteriemia y fungemia se establecen cuando la multiplicación de los microorganismos en la sangre supera la capacidad del sistema inmune para eliminarlos. (Prats, 2006).

La detección a tiempo de la bacteriemia y de la fungemia, seguida de la identificación rápida de los patógenos y la determinación del antibiograma, puede tener gran importancia diagnóstica y pronóstica, dado que esto implica un oportuno tratamiento y una rápida recuperación en los pacientes. (Koneman, 2008).

1.2 Generalidades de bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se consideran procariontes. Se reproducen por fisión binaria, salvo excepciones viven de forma libre, poseen toda información genética, sistemas generadores de energía y biosintéticos necesarios para su replicación. (Tortora, 2007).

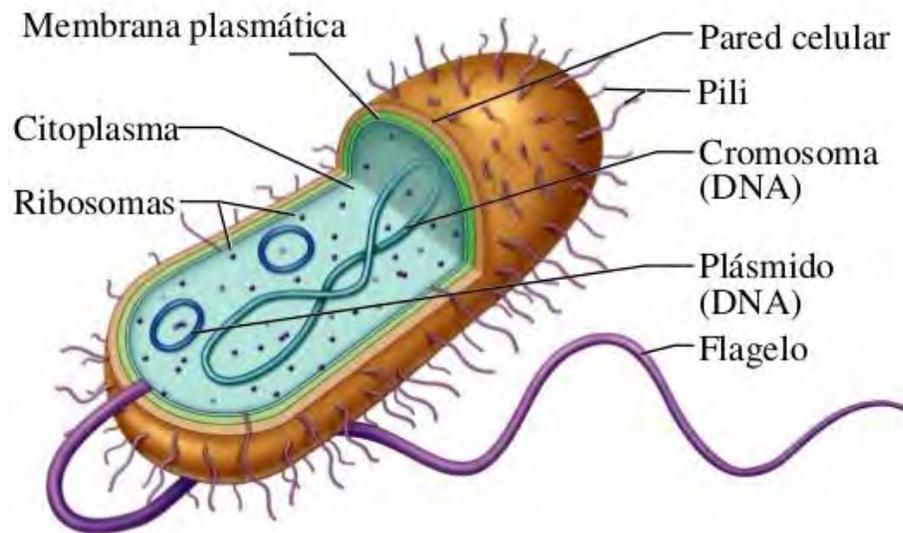


Figura 1. Estructuras principales de las bacterias.

Imagen: Mayeli J. Villa, en Laboratoryclic: <http://laboratoryclic.blogspot.mx/2015/09/bacteriologia.html?view=flipcard>

(Revisado el 15/12/2016)

Las bacterias se encuentran en cualquier lugar del entorno humano: suelo, atmósfera, entre otros lugares. Los determinantes ecológicos establecen las características de las mismas. Esas características, se ven representadas en la variedad de especies, el número poblacional, los requerimientos nutricionales, utilización del oxígeno para su metabolismo, entre otros. En la morfología bacteriana se encuentran características mayores como el tamaño, la forma o estructura y tipo de agrupación. Estas características algunas veces se relacionan con el género y en ocasiones con una especie determinada. (Montoya, 2008).

La forma de las células bacterianas depende de la pared celular que les proporciona rigidez y elasticidad. Individualmente pueden aparecer como elementos elipsoidales, esféricos, alargados o cilíndricos y en espiral. Cada una de estas formas se clasifican en: cocos, bacilos y espirales. A su vez las bacterias individuales pueden formar pares, cadenas, racimos u otros agrupamientos. (Montoya, 2008).

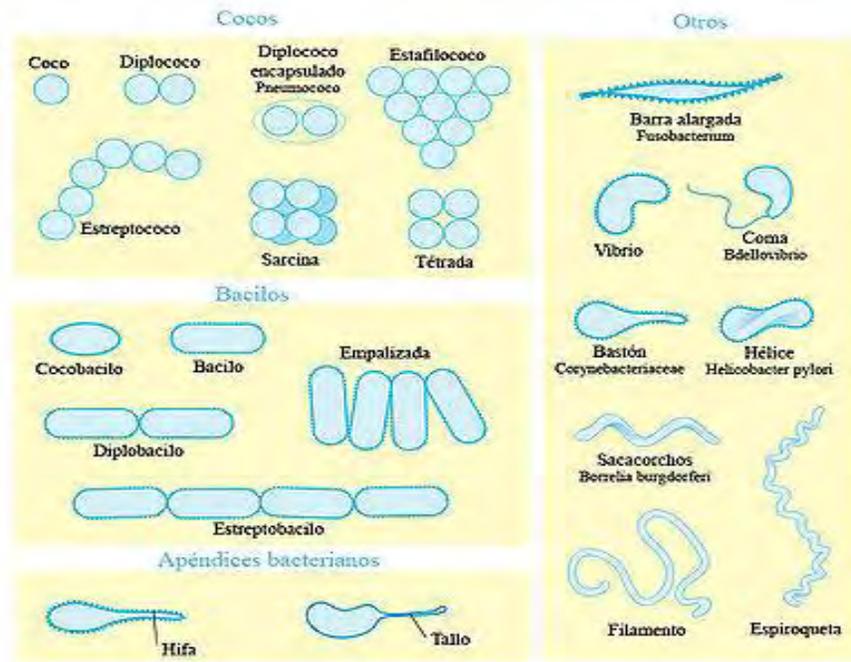


Figura 2. Principales formas y agrupaciones bacterianas.

Imagen: Mariana Ruiz, en Wikimedia Commons. Modificada por Molina J.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html> (Revisado el 10/12/2016)

Según la pared celular con la que cuentan las bacterias va a variar en su complejidad arquitectónica. Esta diferencia sirve para dividir las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias Gram Positivas y las Gram Negativas, dicha división nos facilita el estudio de las bacterias. Esta división se basa en el hecho de que por las diferencias en la estructura y la composición de la pared celular, las bacterias se tiñen de diferente color cuando se utiliza una técnica de tinción desarrollada por Christian Gram en 1884. (Vera, 2004).

Esta coloración se basa en la capacidad de las bacterias de retener el colorante primario (Cristal Violeta), aun después de haber sido decoloradas con alcohol cetona, el resultado de la técnica nos da bacterias Gram Positivas (color violeta) y bacterias Gram Negativas (color rosado). (Montoya, 2008).

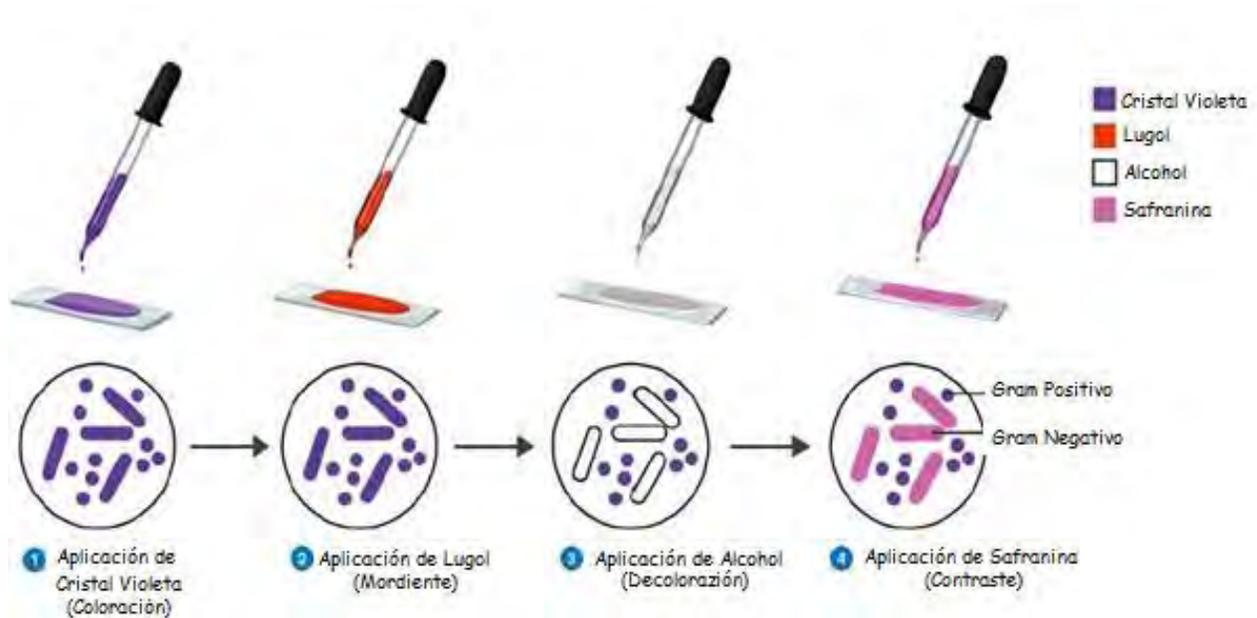


Figura 3. Tinción de Gram.

Imagen: Analizate Lab, <http://analizatelab.blogspot.mx/2014/08/la-tincion-gram.html> (Revisado el 16/12/2016)

1.2.1 Gram Positivas y Gram Negativas

Las bacterias Gram Positivas poseen una pared celular que está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una estructura gruesa y rígida. Además la pared celular de estas las bacterias contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato. Los ácidos teicoicos se dividen en dos: el ácido lipoteicoico, que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unida a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que está unido a la capa de peptidoglucano. (Tortora, 2007).

Estos ácidos también pueden contribuir al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis, por lo cual tiene una resistencia a la ruptura mecánica. Por último, los ácidos teicoicos son responsables de una gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular y en consecuencia permiten la identificación de las bacterias mediante ciertas pruebas de laboratorio. (Tortora, 2007).

Por su parte, las bacterias Gram Negativas poseen una pared celular compuesta por una capa o muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. La pared celular de dichas bacterias no contienen ácidos teicoicos y el hecho de que contengan una escasa cantidad de péptidoglucano aumentan su susceptibilidad a la ruptura mecánica, mientras que su membrana externa está compuesta por lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y fosfolípidos, esta membrana externa cumple diversas funciones especializadas, su intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis y la actividad del complemento, dos componentes de las defensas del hospedero. (Tortora, 2007).

El componente LPS de la membrana externa es responsable de dos características importantes de las bacterias Gram negativas, en primer lugar la fracción polisacárida está compuesta por azúcares llamados polisacáridos O que actúan como antígenos y son útiles para diferenciar las distintas especies de Gram negativas y en segundo lugar, la porción lipídica del lipopolisacárido, denominado lípido A, se conoce con el nombre de endotoxina y ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del hospedero. (Tortora, 2007).

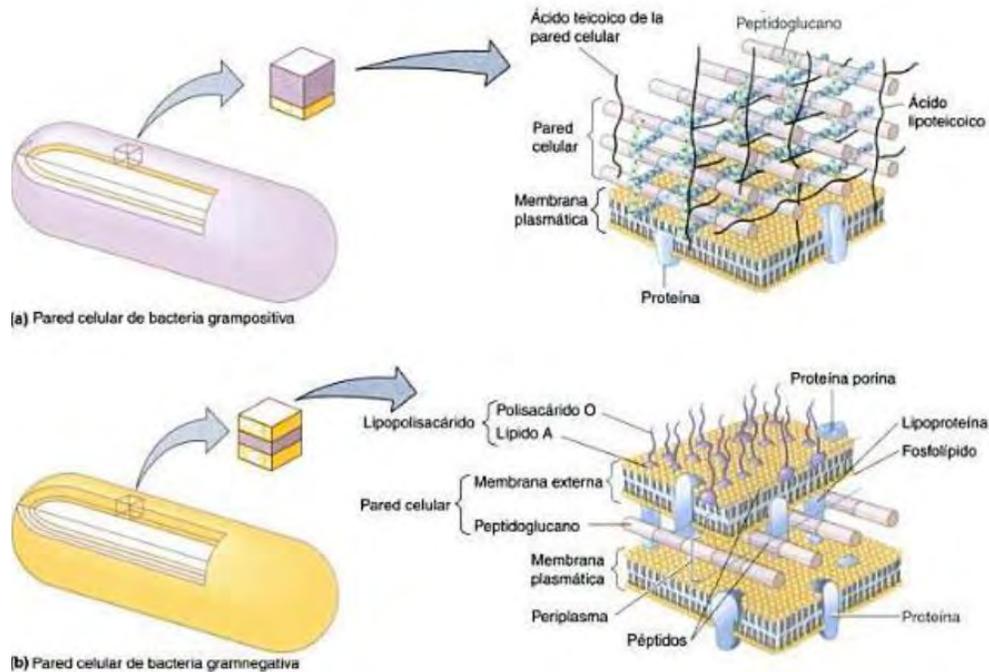


Figura 4. Diferencias de pared celular entre Gram Positivas y Gram Negativas.

Imagen: Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana. p. 87.

1.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una bacteria Gram Positiva, es un coco agrupado en racimos, anteriormente era considerado como un microorganismo comensal inocuo en la piel humana, pero hoy en día se considera como un importante patógeno oportunista, pues es la causa más frecuente de las infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes con dispositivos médicos permanentes (Koneman, 2008).

Con respecto a la patogenicidad, *Staphylococcus epidermidis* es capaz de producir macromoléculas de superficie que inician y luego aumentan la adhesión bacteriana a la superficie plástica de cuerpos extraños. La adherencia inicial parece estar mediada por una adhesina polisacárida llamada PS/A y otras proteínas de superficie. (Otto, 2009).

La PS/A se trata de un polímero de galactosa-arabinosa de alto peso molecular, después de la adherencia inicial, hay otra fase llamada de adherencia intracelular que es mediada por un polisacárido llamado PIA y una proteína extracelular; esto permite la formación de varias capas de células bacterianas adheridas entre sí que forman el llamado biofilm. Este biofilm sirve para proteger a los microorganismos de los agentes antimicrobianos y de las células fagocíticas. En general, es necesaria la remoción del cuerpo extraño para lograr la cura de la infección. (Otto, 2009).

Para su identificación se utiliza la tinción de Gram, donde se observan cocos positivos agrupados en racimos, se aíslan en Agar Nutritivo o Sangre donde la morfología colonial es de colonias pequeñas blancas, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa; tras realizar las pruebas bioquímicas primarias se tendrá que son Catalasa positiva y Oxidasa negativa, para diferenciar de *Staphylococcus aureus* se realiza la prueba de coagulasa la cual es negativa y la siembra en Agar Sales Manitol la cual es negativa. (Koneman, 2008).

1.2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram Positiva, es un coco agrupado en racimos, forma parte de la microbiota normal de la piel, especialmente de la nariz y el perineo de los seres humanos y los animales, sin embargo se destaca como un importante patógeno humano que produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. (Hurtado, 2002).

Staphylococcus aureus posee un arsenal de elementos que justifican su capacidad patogénica y de defensa ante los mecanismos de defensa del hospedero y los antimicrobianos utilizados para su combate, en el siguiente cuadro se muestran los determinantes de patogenicidad en *Staphylococcus aureus*. (Hurtado, 2002).

Cuadro 1. Determinantes de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidoglicano ▪ Ácidos teicoicos ▪ Proteína A ▪ Cápsula mucoide 	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
Enzimas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulasa ▪ Estafiloquinasas ▪ Hialuronidasa ▪ Lipasas 	Formación de absceso Destrucción del coagulo Invasión hística Colonización
Toxinas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas ▪ Leucocidina ▪ Toxina exfoliatina ▪ Toxina del shock tóxico ▪ Enterotoxinas 	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

Respecto a su identificación, además de la tinción de Gram donde se observan cocos positivos con tendencia a agruparse en racimos. El aislamiento nos permitirá observar las características de las colonias. En medios no selectivos, *Staphylococcus aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo. Cuando crecen en Agar Sangre se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. En las pruebas primarias se tiene que son Catalasa positiva y Oxidasa negativa, al realizar la prueba de coagulasa esta es positiva y la siembra en Agar Sales Manitol resulta positiva. (Koneman, 2008).

1.2.4 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram Negativa, en forma de bacilo no móvil que pertenece a la familia de las Enterobacterias, puede presentar o no cápsula y es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. (López, 2009).

Cabe resaltar que es una bacteria con alta importancia dado que presenta una variedad de enzimas β -lactamasas las cuales pueden destruir las estructuras químicas de los antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. (Sirijan, 2016).

Generalmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, debido a que cuenta con lipopolisacáridos que se extienden por encima de la cápsula evitando que su pared celular sea lisada, entonces la cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares inhibiendo la activación del complemento. (López, 2009).

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia del agente a las células del hospedero, función que en este caso es desempeñado por los *pilis*, de los cuales existen dos tipos predominantes en *Klebsiella pneumoniae*; el tipo 1 que tipo está asociado en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, adhiriéndose a las células del túbulo proximal, su adherencia a las células del tracto respiratorio afecta la resistencia a la colonización, lo cual conlleva a la proliferación de patógenos potenciales y puede conducir a neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica y el tipo 3 que interviene en la adherencia a las células endoteliales y los epitelios del tracto respiratorio y urinario. (López, 2009).

1.2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram Negativo con flagelos peritricos, que pertenece a la familia de las Enterobacterias, se considera la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento, por lo cual es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad pero existen varios virotipos de *Escherichia coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos. (Iguchi, 2009).

Se han determinado varios tipos de *Escherichia coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* enterotoxígena (ECET), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (ECAD). (Tortora, 2007).

En el siguiente cuadro se enlistan los factores de patogenicidad asociados a los diferentes virotipos de *Escherichia coli*.

Cuadro 2. Determinantes de patogenicidad de *Escherichia coli*.

Bacteria	Adhesinas	Exotoxinas
ECET	Antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	toxina termolabil (LT-1) ; Toxina termoestable (STa)
ECEP	Pilis formadores de haces (BFP); intimina	
ECEA	Fimbrias adherentes agregantes (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Toxina termoestable enteroagregante
ECEH	BFP; Intimina	Toxina de shiga (stx-, stx-2)
ECEI	Antígeno del plásmido invasivo	Hemolisina (HlyA)

1.2.6 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un bacilo Gram Negativo, inmóvil, no fermentador, oxidasa negativo y catalasa positivo y es considerado como un patógeno oportunista causante de neumonías, asociadas a ventilación, infecciones del tracto urinario, meningitis, bacteriemias, endocarditis y peritonitis. (Cisneros, 2003).

Las características más notables como un patógeno nosocomial son su capacidad de sobrevivir en el ambiente hospitalario (inanimado) y desarrollar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos. (Villar, 2014).

Acinetobacter baumannii habita normalmente en la piel, en las membranas de la mucosa respiratoria y gastrointestinal además puede sobrevivir en el suelo, en superficies húmedas, y a diferencia del resto de bacterias Gram Negativas, puede resistir por un largo periodo en ambientes secos. (Zuñiga, 2010).

Aunque las características especiales del género *Acinetobacter* lo han convertido en patógeno nosocomial exitoso, es poco lo que se ha avanzado en el conocimiento de los factores de virulencia y las estrategias de persistencia. (Zuñiga, 2010).

La presencia de pilis como importante factor patogénico ha sido relacionada con la capacidad de la bacteria para adherirse a las superficies plásticas y de vidrio, asegurando la formación de biofilm en instrumentos como los dispositivos médicos. Algunas investigaciones han determinado que durante la etapa de maduración del biofilm se requiere la participación de la proteína asociada a biofilm (Bap), esta proteína que es específica de *Acinetobacter baumannii* se localiza en la membrana externa, facilitando la adhesión intercelular, lo que contribuiría a dar grosor y volumen al biofilm. La potencial habilidad de *Acinetobacter baumannii* para formar biofilm explicaría en gran medida su alta resistencia a los antibióticos y las propiedades de sobrevivencia en el ambiente seco por largos períodos. (Zuñiga, 2010).

1.2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram Negativa con forma de bacilo, cuenta con un flagelo y es móvil, además es aerobio, se considera un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales. Es un habitante común de agua, suelos y plantas y en los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. (Luján, 2014).

Pseudomonas aeruginosa puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria, dichas infecciones son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos. (Ochoa, 2013).

Pseudomonas aeruginosa produce una amplia variedad de factores de patogenicidad, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, pilis, toxinas, exoenzimas y biofilm. Algunos bastante estudiados son el alginato que es un polímero de polisacáridos, que facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos, inhibe a los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedero. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. Otras toxinas vinculadas a la virulencia son exoS, exoT y exoU, las primeras 3 han sido. ExoS y ExoT desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto ExoU favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y también causa la muerte celular. (Luján, 2014).

1.3 Generalidades de levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, pertenecientes a los ascomicetos, son ovaes esféricas o cilíndricas, la gran mayoría son unicelulares pero algunas como *Candida albicans* pueden formar filamentos. Las levaduras no poseen flagelos ni ningún otro órgano de locomoción. Su reproducción normalmente es por bipartición, fisión binaria o por gemación, es decir, producen unos abultamientos en la célula madre llamados yemas que crecen hasta separarse. (Montoya, 2008).

Las levaduras se encuentran con frecuencia en las hojas y las flores, aunque en número muy pequeño, siendo los insectos un importante vector de diseminación de las mismas. Están sobre la epidermis de frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. (Ingraham, 1998).

El suelo es un importante reservorio, desde el cual pueden llegar a los alimentos, pero también suelen hallarse en el agua de lagos y ríos. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples. (Ingraham, 1998).

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la microbiota normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal. (Montoya, 2008).

1.4.1 Sangre

La sangre es un tejido líquido que recorre el organismo, a través de los vasos sanguíneos que transporta las células necesarias para llevar a cabo las funciones vitales (respirar, formar sustancias, defenderse de agresiones). La sangre transporta los principios nutritivos desde el aparato digestivo hasta las células, donde se recogen también las sustancias de desecho para eliminarlas gracias a los riñones, el hígado y otros órganos de excreción. También es la encargada de regular el transporte de oxígeno y la eliminación del anhídrido carbónico. Tiene un papel importante en funciones como la coagulación, la inmunidad y el control de la temperatura corporal. (Ross, 2012).

La mayoría de los análisis de sangre se hacen con muestras de sangre venosa. Para la realización de un hemocultivo se toma la muestra mediante punción periférica venosa o arterial, o a través de un catéter arterial, venoso o central.

El personal debe lavarse las manos, colocarse guantes y proceder a desinfectar los tapones de las botellas de hemocultivo con alcohol al 70% y posteriormente con una solución iodada, después se debe seleccionar el sitio de venopunción y desinfectar el área con alcohol al 70%, después en un ambiente totalmente estéril desinfectar nuevamente el área a puncionar con una solución iodada y dejar secar, colocar el torniquete y realizar la punción sin palpar, la muestra se toma directamente en la botella de hemocultivo, por lo cual se debe usar sistema al vacío con una camisa especial. Finalmente después de extraer un volumen de 10 mL de sangre por frasco, retirar el torniquete y el sistema al vacío, y limpiar los restos de solución iodada de la piel del paciente. (Strasinger, 2008).

Los análisis de sangre son una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico, dentro de los análisis se puede tomar muestras de sangre para realizar cultivos y observar si crecen microorganismos que causan enfermedades infecciosas, con el fin de detectarlos y ver además cómo se comportan exactamente y la sensibilidad que muestran a diferentes antibióticos. (Ángel, 2006).

1.4.2 Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El líquido cefalorraquídeo es un líquido transparente, que baña el encéfalo y la médula espinal. Proporciona un sistema fisiológico para aportar nutrientes al tejido nervioso, eliminar los desechos metabólicos y producir una barrera mecánica para proteger el cerebro y la médula espinal contra el traumatismo. El líquido cefalorraquídeo se produce en los plexos coroideos de los 2 ventrículos laterales y del tercero y el cuarto ventrículos. En los adultos se producen alrededor de 20 mL de líquido por hora. El líquido fluye a través del espacio subcaracnoideo localizado entre las aracnoides y la piamadre. (Strasinger, 2008).

El LCR se obtiene mediante punción lumbar entre las tercera, cuarta o quinta vertebra lumbares, aunque dicho procedimiento no es complicado requiere ciertas precauciones como la determinación de la presión intracraneal y una técnica cuidadosa para evitar la infección o el daño neural. (Strasinger, 2008).

Para realizar la punción lumbar el paciente debe recostarse de lado con las rodillas encogidas hacia el abdomen y la barbilla pegada al tórax, se debe limpiar la espalda, e inyectar anestesia local en la región lumbar, después se introduce una aguja espinal y se medirá la presión del líquido cefalorraquídeo y se recogerá una muestra de 10 mL, se retira la aguja y se limpia la zona, finalmente se inoculan las botellas de hemocultivo en un ambiente estéril. (Strasinger, 2008).

Dado la molestia que le crea al paciente y las posibles complicaciones que puedan aparecer durante la recolección de la muestra, el personal del laboratorio debe manipular las muestras con sumo cuidado de realizar las pruebas de forma inmediata. (Strasinger, 2008).

1.4.3 Líquido Peritoneal

El líquido peritoneal es la sustancia responsable de la lubricación de la pared abdominal y los órganos en la cavidad abdominal. Ayuda a prevenir la fricción entre los órganos de la cavidad pélvica a medida que avanzan, mientras que se realiza la digestión de los alimentos. El líquido consiste en agua, electrolitos, anticuerpos, células blancas de la sangre, y bioquímicos. La acumulación de líquido entre las membranas peritoneales se denomina llama ascitis y el líquido suele denominarse líquido ascítico en lugar de líquido peritoneal. (Strasinger, 2008).

La siembra de líquido en frascos para hemocultivo a la cabecera del paciente aumenta la recuperación de microorganismos anaerobios. La tinción de Gram y los cultivos para aerobios y anaerobios se realizan cuando se sospecha peritonitis bacteriana. (Strasinger, 2008).

La muestra es tomada con el paciente recostado boca arriba inclinado hacia su lado izquierdo, se selecciona es sitio de punción y se limpiara con una solución iodada, se deja secar y se coloca un anestésico tópico y con ayuda de una jeringa se extraerá un volumen de muestra de hasta 10 mL, retirar la jeringa, limpiar la zona y colocar un apósito comprensivo, finalmente se inoculan las botellas de hemocultivo en un ambiente estéril. (Strasinger, 2008).

1.5 Hemocultivo

Un hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por punción venosa sencilla o acceso intravenoso. Es un estudio recomendado para confirmar una bacteriemia cuando ésta se sospecha en pacientes con o sin foco obvio de infección. (Sánchez, 2010).

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, según el lugar de la toma de la muestra pueden ser hemocultivos periféricos o centrales, también pueden clasificarse según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos según la sospecha, por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos. (García, 2015).

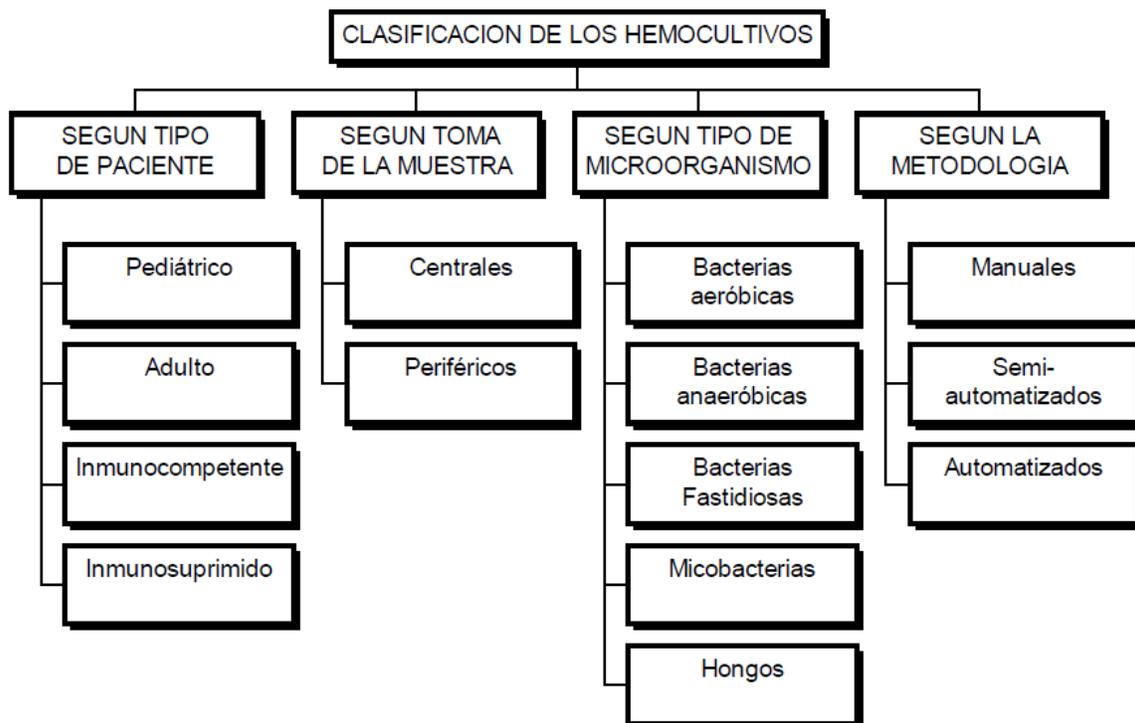


Figura 6. Clasificación de los hemocultivos.

Imagen: García, P. (2015) Hemocultivos. Pontificia Universidad Católica de Chile

El hemocultivo debe obtenerse siempre que sea posible antes de la administración del tratamiento antimicrobiano y debe complementarse con el cultivo de otras muestras clínicas, como líquido cefalorraquídeo, orina, muestras del tracto respiratorio inferior o líquido sinovial en pacientes con sospecha de meningitis, pielonefritis, neumonía o artritis séptica, respectivamente (Cueto, 2007).

Se han propuesto algunas recomendaciones que permiten predecir una bacteriemia verdadera; sin embargo, la decisión final de la significación clínica de un hemocultivo positivo depende, en última instancia, de las manifestaciones clínicas y del curso de la enfermedad en un paciente determinado (Herrera, 2010).

Un hemocultivo puede ser positivo sin que ello represente un episodio verdadero de bacteriemia. Es frecuente que la propia microbiota cutánea del paciente o del personal que realiza la extracción pueda contaminar la muestra de sangre. Se denomina bacteriemia verdadera a la producida por microorganismos realmente presentes en la sangre de los pacientes y bacteriemia falsa a la causada por una contaminación accidental del cultivo. La distinción entre bacteriemias verdadera y falsa es un asunto de la máxima importancia y trascendencia para el paciente. (Rodríguez, 2012).

Por lo general, un hemocultivo es insuficiente en la búsqueda del microorganismo, dos o más cultivos son adecuados cuando la bacteriemia se debe a un patógeno no contaminante, tres cultivos son adecuado ante la presencia de bacteriemia persistente y cuatro cultivos cuando se sospecha de un germen comúnmente contaminante como los *Staphylococcus* coagulasa negativo. (González, 2011).

A pesar de los grandes avances tecnológicos en el diagnóstico microbiológico de las últimas dos décadas, el hemocultivo continúa vigente como el mejor procedimiento para identificar los procesos infecciosos, es la "prueba de oro" en la identificación de bacteriemia y es una prueba fácil de realizar y se encuentra disponible en los laboratorios de casi todos los hospitales, lográndose hacer una evaluación de la susceptibilidad antibiótica de los gérmenes más comúnmente encontrados. (Shimabuku, 2004).

Sin embargo, existen múltiples variables que pueden dificultar el diagnóstico, tal es el caso de que la muestra preferentemente debe tomarse en picos febriles o que se requieren inóculos mayores que en otros procedimientos bacteriológicos para lograr una adecuada identificación y aislamiento del microorganismos, es por ello que se hace necesario mejorar la manera en que se recuperan dichos microorganismos a partir de la muestra sanguínea para poder reducir el tiempo de procesamiento.

1.6 Principales microorganismos presentes en hemocultivo

El conocimiento del tipo y frecuencia de los microorganismos responsables de bacteriemia y su perfil de susceptibilidad antimicrobiana en cada centro hospitalario es importante para establecer el tratamiento empírico más adecuado. (Cortéz, 2012).

Según un estudio realizado en el Hospital Pediátrico de Sinaloa de febrero del 2012 a febrero del 2013 los microorganismos más frecuentemente aislados en hemocultivos son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*; le siguen en frecuencia *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Cryptococcus laurentii*. (López, 2013).

Tabla 1. Principales microorganismos presentes en hemocultivo.

Nombre	Tipo y Agrupación	Localización	Identificación	Notas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos G + en Racimos	Bacteria residente de la piel y mucosas sanas del ser humano	Catalasa + Oxidasa - Coagulasa - Manitol -	Anteriormente considerado contaminante con escasa importancia clínica.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos G + en Racimos	Medio ambiente, aunque también forma parte de la microbiota humana normal.	Catalasa + Oxidasa - Coagulasa + Manitol +	Patógeno más importante dentro de los <i>Staphylococcus</i> , principal agente causal de infecciones nosocomiales.
<i>Candida albicans</i>	Levadura	Microbiota de la piel y membranas mucosas, además de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos.	Utilización de CHOS + ChromoAgar	Es el hongo más comúnmente aislado en muestras clínicas.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos G - sin agrupación Flagelado	Presente en agua, tierra, animales o plantas, debido a que sus necesidades alimenticias son mínimas.	Oxidasa + β-hemolisis Píocianina +	Produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos G - sin agrupación	Se encuentra en microbiota intestinal.	MIO: - - - - IMViC: - - + +	Enterobacteria de aislamiento clínico frecuente.
<i>Serratia marcescens</i>	Bacilo G - sin agrupación	Es microbiota intestinal, en el ambiente y reservorios pobres en nutrientes.	VP + Motilidad + Indol - DNAsa +	Su adquisición es por lo general nosocomial, asociada a catéter.
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos G - sin agrupación Flagelado	Se encuentra en microbiota intestinal.	IMViC: + + - - Lactosa: +	Está implicada en un amplio espectro de enfermedades agrupadas en tres síndromes clínicos.
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Levadura	Medio ambiente, principalmente del suelo contaminado con excrementos secos de palomas y otras aves	Urea -	Es la especie más importante desde el punto de vista médico.

1.7 Sistemas automatizados de detección e identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana.

En la actualidad se busca acortar los tiempos de detección e identificación de microorganismos dentro del laboratorio para lograr un diagnóstico oportuno, además de la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos, con ese fin se comenzaron a utilizar los sistemas automatizados, dado que estos pueden detectar crecimiento de microorganismos en una suspensión con y sin antimicrobianos, antes de que se pueda observar turbidez, lo que no siempre se es posible mediante los métodos convencionales.

Por otro lado, la implementación de sistemas automatizados confiere una mejor estandarización y reproducibilidad de los resultados y disminución de la carga de trabajo en los laboratorios ya que los métodos de determinación de sensibilidad convencionales son laboriosos y tardados.

En el mercado existen diversos modelos según la casa comercial que lo maneje, pero el fundamento es el mismo en todos: Tener una detección e identificación oportuna del microorganismo presente en la muestra.

En la tabla 2 se muestran algunos de los modelos disponibles para la detección de microorganismos en hemocultivos y otros líquidos corporales, entre ellos el que se utilizó en el desarrollo de este trabajo “VersaTrek”, mientras que en la tabla 3 se muestran algunos modelos disponibles para la identificación y determinación de sensibilidad bacteriana entre ellos “Vitek 2”, sistema utilizado en este trabajo.

Tabla 2. Sistemas automatizados de detección bacteriana.

Equipo	Fundamento	Imagen
<p>Bact-Alert® 3D (BioMérieux)</p>	<p>Sistema automatizado, con capacidad de incubar y detectar microorganismos en 240 muestras. Utiliza botellas con medio de cultivo estéril y con un sensor colorimétrico que cambia de gris a amarillo en presencia de CO₂ producido por el crecimiento de microorganismos. Dichos sensores son escaneados cada 10 minutos, Una vez que el crecimiento es detectado, el sistema emite una alarma sonora y visual y el dato de la muestra es grabado.</p>	 <p>The image shows a dark blue Bact-Alert 3D system. It features a top-mounted control panel with a small screen and a keypad. Below the panel is a large, open compartment containing a grid of 240 small, multi-colored (yellow, red, blue) sensors used for monitoring bacterial growth.</p>
<p>BATEC FX® (Becton Dickinson)</p>	<p>Sistema automatizado de hemocultivos que permite el crecimiento y la detección de microorganismos con una monitorización continua. Cuenta con sensores fluorescentes que permite realizar la detección de microorganismos, ya que los frascos cuentan con sensores que responden a los cambios en el contenido de gas producido, los sensores fluorescentes miden nivel de fluorescencia el cual corresponde a la cantidad de dióxido de carbono liberado por los organismos. La medición es interpretada por el sistema de acuerdo con parámetros pre-programados de positividad. Se considera no invasivo al no perforar las botellas.</p>	 <p>The image shows a tall, grey BATEC FX system. It has a central control panel with a screen and buttons. A prominent feature is a large, colorful (rainbow) sensor or probe extending from the top of the unit, used for continuous monitoring of bacterial growth in bottles.</p>
<p>VersaTrek® (Thermo Scientific Microbiology)</p>	<p>Sistema automatizado de detección microbiana, detecta cualquier tipo de gas producido o consumido por microorganismos, sus botellas de cultivo utilizan medio "REDOX", que promueven el consumo y producción de gas, los cambios de presión en las botellas de cultivo es monitoreada cada 24 minutos.</p>	 <p>The image shows a VersaTrek system with a dark blue base and a white upper section. It features a vertical array of 12 sample bottles or sensors. A central control panel with a screen is located on the right side of the unit.</p>

Tabla 3. Sistemas automatizados de identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana.

Equipo	Fundamento	Imagen
<p>Abactor II® (Menarini Diagnostics)</p>	<p>Sistema semiautomatizado que identifica bacterias Gram Negativas y determina la sensibilidad antimicrobiana. Utiliza 3 tipos de rotores que incluyen pruebas bioquímicas y antibióticos que son inoculados con una suspensión bacteriana. Basado en técnicas de dilución en medio líquido.</p>	
<p>Phoenix® (Becton Dickinson)</p>	<p>Sistema automatizado para realizar simultáneamente de 1 a 100 determinaciones de identificación bacteriana y de sensibilidad antimicrobiana. El Sistema Phoenix utiliza sustratos cromogénicos y fluorogénicos, así como sustratos con fuentes de carbono únicas para la identificación de los microorganismos.</p>	
<p>MicroScan WalkAway® (Dade Behring)</p>	<p>Sistema automatizado, para la identificación de bacterias así como la determinación de sensibilidad antimicrobiana, realiza la incubación, adición de reactivos y la lectura de los paneles. Utiliza tecnología de fibras ópticas que permite la lectura espectrofotométrica de todo el panel simultáneamente.</p>	
<p>Vitek 2® (BioMérieux)</p>	<p>Sistema automatizado para la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Tiene un sistema óptico de transmitancia el cual permite la interpretación de las reacciones de prueba utilizando diferentes longitudes de onda en el espectro visible.</p>	

1.8 Sistema de detección bacteriana “VersaTrek”

Es un sistema automatizado de detección microbiana, que puede detectar cualquier tipo de gas producido o consumido por microorganismos. Al no limitarse a la producción de CO₂, como otros sistemas, “VersaTrek” puede detectar una gama más amplia de microorganismos, tanto los que tienen requisitos especiales de cultivo como los de cultivo sencillo, entre los microorganismos que detecta se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brucella suis*, *Helicobacter spp*, *Nocardia spp*, y *Candida*. (Thermo Fisher, 2011).



Figura 7. Equipo “VersaTrek”.

Emplea medios únicos “REDOX” para promover tanto el consumo como la producción de gas, detectando cambios de la presión en el espacio superior de la botella, los medios “REDOX” altamente enriquecidos admiten una amplia variedad de microorganismos, con lo que se mejora la capacidad de “VersaTrek” para recuperar más fácilmente microorganismos que tienen requisitos especiales de cultivo. Dos medios son suficientes por paciente pues existen para microorganismos aerobios y anaerobios. (Thermo Fisher, 2011).



Figura 8. Botellas con medios “REDOX”.

Imagen: VersaTrek, <http://www.trekds.com/products/versatrek/media.asp> (Revisado 20/12/2016).

“VersaTrek” detecta el crecimiento mico-bacteriano monitorizando automáticamente la tasa de consumo de oxígeno en el espacio de cabeza del frasco de cultivo cada 24 minutos. “VersaTrek” tiene un software que ofrece acceso con un solo botón a todos los resultados y muestras de pacientes. El software muestra los resultados mediante gráficas “Presión vs Tiempo (hrs)” para ver el desarrollo del microorganismo con el paso de los días. (Thermo Fisher, 2011).

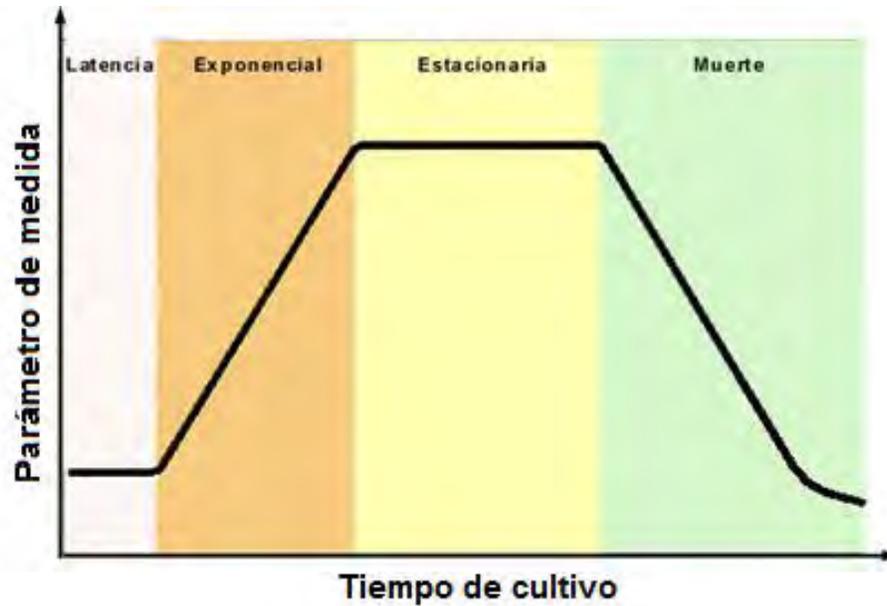


Figura 9. Típica curva de crecimiento bacteriano

Imagen: Microbiología, <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/curva-del-crecimiento.html> (Revisado 20/12/2016).

Con su exclusiva tecnología de detección se consiguen resultados más rápidos con menos restricciones, reduciendo así el tiempo de estancia y los costos de tratamiento, lo cual repercute en la mejora de los cuidados al paciente. (Thermo Fisher, 2011).



Figura 10. Software del equipo "VersaTrek".

1.9 Sistema de identificación y sensibilidad bacteriana “Vitek 2”

Es un sistema automatizado para la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad antimicrobiana; este sistema utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. (BioMérieux, 2006).



Figura 11. Equipo “Vitek 2”.

El sistema “Vitek 2” cuenta con los instrumentos para la preparación de la muestra, incubación, interrogación óptica y estuche para la prueba. Entre ellos el “DensiChek” que es un densitómetro óptico, el cual es utilizado para la estandarización del inóculo de la muestra, “DensiChek” mide la densidad óptica de una suspensión de microorganismo, proporciona valores en unidades McFarlad, proporcional a las concentraciones de microorganismos. (BioMérieux, 2006).



Figura 12. “DensiChek”.

Imagen: BioMérieux, <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admin/tablas/productos/VitekCompact.pdf>
(Revisado 21/12/2016).

Otro instrumento con el que cuenta el sistema “Vitek 2” es “Smart Carrier Station” la cual consiste en una computadora tipo PC, un escáner de código de barras conectado a la computadora y un cassette con capacidad para hasta 15 tarjetas. El escáner de códigos se encarga de vincular de manera virtual el tipo de tarjeta que se utilizará en el cassette con el sistema “Vitek 2” permitiendo la correcta lectura de cada tarjeta utilizada. (BioMérieux, 2006).

Después de preparar y estandarizar el inóculo, el sistema “Vitek 2” lleva a cabo todas las tareas necesarias para complementar la identificación y las pruebas de susceptibilidad como la dilución del inóculo, llenado del estuche de prueba, sellado y transferencia al incubador, monitoreo de los cambios metabólicos, transferencia de los resultados a la estación de trabajo y descarte de los estuches de prueba. (BioMérieux, 2006).

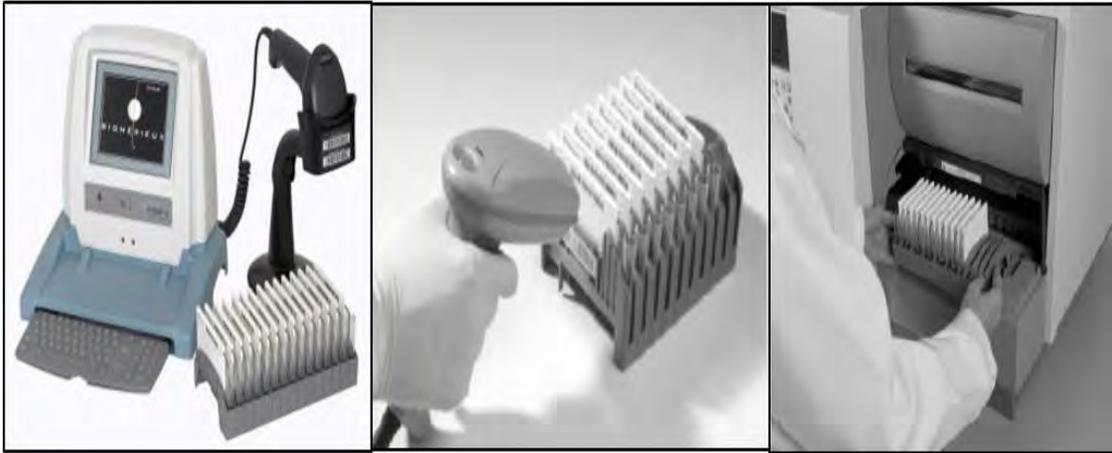


Figura 13. Uso del instrumento “Smart Carrier Station”.

Imagen: BioMérieux, <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admin/tablas/productos/VitekCompact.pdf> (Revisado 21/12/2016).

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos, cada uno contiene un sustrato de prueba individual, estos sustratos miden varias actividades metabólicas como acidificación y alcalinización. Existen varios tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos: GN (Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores), GP (Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos) y YST (Levaduras y organismos levaduriformes), además de tarjetas para determinar la sensibilidad antimicrobiana AST-GP para Gram Positivos y AST-GN para Gram Negativos. (BioMérieux, 2006).



Figura 14. Tarjetas reactivas GP, GN y YST.

Imagen: BioMérieux, <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admin/tablas/productos/VitekCompact.pdf> (Revisado 21/12/2016).

En las siguientes tablas se muestran los sustratos que contienen los diferentes tipos de tarjetas de identificación GP, GN y YST. (BioMérieux, 2006).

Tabla No. 4 Pruebas que contiene la tarjeta GP. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
2	D-AMYGDALYN	56	PULLULAN
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	57	D-RAFFINOSE
5	D-XYLOSE	58	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	59	SALICIN
9	BETA-GALACTOSIDE	60	SACCHAROSE/SUCROSE
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	62	D-TREHALOSE
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	63	ARGININE DIHYDROLASE 2
14	CYCLODEXTRIN	64	OPTOCHIN RESISTANCE
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE		
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE		
17	ALPHA-MANNOSIDASE		
19	PHOSPHATASE		
20	Leucine ARYLAMIDASE		
23	L-Proline ARYLAMIDASE		
24	BETA GLUCURONIDASE		
25	ALPHA-GALACTOSIDASE		
26	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE		
27	BETA-GLUCURONIDASE		
28	Alanine ARYLAMIDASE		
29	Tyrosine ARYLAMIDASE		
30	D-SORBITOL		
31	UREASE		
32	POLYMIXIN B RESISTANCE		
37	D-GALACTOSEE		
38	D-RIBOSE		
39	L-LACTATE alkanization		
42	LACTOSE		
44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE		
45	D-MALTOSE		
46	BACITRACIN RESISTANCE		
47	NOVOBIOCIN RESISTANCE		
50	GROWTH IN 6.5% NaCl		
52	D-MANNITOL		
53	D-MANNOSE		
54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE		

Tabla No. 5 Pruebas que contiene la tarjeta GN. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
2	Ala-Phe-PrO-ARYLAMIDASE	48	LYSINE DECARBOXYLASE
3	ADONITOL	52	DECARRBOXYLASE BASE
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	53	L-HISTIDINE assimilation
5	L-ARABITOL	56	COUMARATE
7	D-CELLOBIOSE	57	BETA-GLUCORONIDASE
9	BETA-GALACTOSIDASE	58	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)
10	H2S PRODUCTION	59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE
11	BETA-N-ACETYL-GUCOSAMINIDASE	61	L-MALATE assimilation
12	Glutamyl Arylamidase pNA	62	ELLMAN
13	D-GLUCOSE	64	L-LACTATE assimilation
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE		
15	FERMENTATION GLUCOSE		
17	BETA-GLUCOSIDASE		
18	D-MALTOSA		
18	D-MANNITOL		
20	D-MANNOSA		
21	BETA-XYLOSIDASE		
22	BETA-Alnine arylamidase pNA		
23	L-Proline ARYLAMIDASE		
26	LIPASE		
27	PALATINOSE		
29	Tyrosine ARYLAMIDASE		
31	UREASE		
32	D-SORBITOL		
33	SACCHAROSE/SUCROSE		
34	D-TAGATOSE		
35	D-TREHALOSE		
36	CITRATE (SODIUM)		
37	MALONATE		
39	5-KETO-D-GLUCONATE		
40	L-LACTATE alkanisation		
41	ALPHA-GLUCOSIDASE		
42	SUCCINATE alkanisation		
43	Beta-N-ACETYL- GALACTOSAMINIDASE		
44	ALPHA-GAÑACTOSIDASE		
45	PHOSPHATASE		
46	Glycine ARYLAMIDASE		
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE		

Tabla No. 6 Pruebas que contiene la tarjeta YST. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
3	L-Lysine-ARYLAMIDASE	55	D-XYLOSE assimilation
4	L-MALATE assimilation	56	DL-LACTATE assimilation
5	Leucine-ARYLAMIDASE	58	ACETATE assimilation
7	ARGININE GP	59	CITRATE (SODIUM) assimilation
10	ERYTHRITOL assimilation	60	GLUCURONATE ASSIMILATION
12	GLYCEROL assimilation	61	L-PROLINE assimilation
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	62	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation
14	BETA-N-ACETYL- GLUCOSAMINIDASE	63	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation
15	ARBUTIN assimilation	64	D-GLUCONATE assimilation
18	AMYGDALIN assimilation		
19	D-GALACTOSE assimilation		
20	GENTIOBIOSE assimilation		
21	D-GLUCOSE assimilation		
23	LACTOSE assimilation		
24	METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation		
26	D-CELLOBIOSE assimilation		
27	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE		
28	D-MALTOSE assimilation		
29	D-RAFFINOSE assimilation		
30	PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1		
32	D-MANNOSE assimilation		
33	D-MELIBIOSE assimilation		
34	D-MELEZITOSE assimilation		
38	L-SORBOSE assimilation		
39	L-RHAMNOSE assimilation		
40	XYLITOL assimilation		
42	D-SORBITOL assimilation		
44	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation		
45	UREASE		
46	ALPHA-GLUCOSIDASE		
47	D-TURANOSE assimilation		
48	D-TREHALOSE assimilation		
49	NITRATE assimilation		
51	L-ARABINOSE assimilation		
52	D-GALACTURONATE assimilation		
53	ESCULIN assimilation		
54	L-GLUTAMATE assimilation		

El sistema “Vitek 2” contiene un sistema óptico de transmitancia el cual permite la interpretación de las reacciones de prueba utilizando diferentes longitudes de onda en el espectro visible. Durante la incubación que se lleva a cabo en un carrusel a temperatura controlada cada pozo es examinado por el escáner de 10 a 14 veces cada 15 minutos, para medir la turbidez o los productos coloreados del metabolismo del sustrato, permitiendo un análisis cinético preciso. (BioMérieux, 2006).

El equipo cuenta con un software que contiene una base de datos de los resultados de los productos de identificación cada uno de los resultados obtenidos se compara con los de la base de datos para determinar si los datos son suficientemente únicos o cercanos a uno o más de los de la base de datos para identificar al microorganismo. Si el software no reconoce un patrón de identificación único, se reporte una lista de microorganismos posibles o se determina que la cepa está fuera del alcance de la base de datos. (BioMérieux, 2006).

El software además de identificar al microorganismo arroja un nivel de confianza de dicha identificación mediante un porcentaje de probabilidad, los diferentes niveles y la información asociada a cada valor se muestran en la tabla 7. (BioMérieux, 2006).

Tabla No. 7 Niveles de confianza de identificación y su significado.

Nivel de confianza de identificación	% Probabilidad
Excelente	96 a 99
Muy Bueno	93 a 95
Bueno	89 a 92
Aceptable	85 a 88

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos determina la susceptibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico específico o un grupo de antibióticos. El microorganismo se pone en contacto con el antibiótico y la prueba revela si el microorganismo crecerá o no en presencia del antibiótico. Esta información es expresada como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). La medida directa de crecimiento que se utiliza es la turbidez de cada tubo. (BioMérieux, 2006).

Tabla No. 8 Antibióticos que contienen las tarjetas AST-GP y AST-GN. (BioMérieux, 2006).

AST-GP	AST-GN
Detección de cefoxitina	Betalactamasas De Espectro Prolongado
Bencilpenicilina	Ampicilina
Ampicilina	Ampicilina/Sulbactam
Oxacilina	Piperacilina/Tazobactam
Gentamicina de nivel alto (sinergia)	Cefazolina
Estreptomicina de nivel alto (sinergia)	Ceftriaxona
Gentamicina	Cefepima
Ciprofloxacino	Aztreonam
Levofloxacino	Ertapenem
Moxifloxacino	Meropenem
Resistencia inducible a clindamicina	Amikacina
Eritromicina	Gentamicina
Clindamicina	Tobramicina
Quinupristina/Dalfopristina	Ciprofloxacino
Linezolid	Tigeciclina
Vancomicina	Nitrofurantoína
Tetraciclina	Trimetoprima/Sulfametoxazol
Tigeciclina	
Nitrofurantoína	
Rifampicina	
Trimetoprima/Sulfametoxazol	

1.10 Sensibilidad Bacteriana

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. (Forbes, 2009).

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas. (Taroco, s.f).

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de rutina, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Estos diferentes métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. (Forbes, 2009).

Según el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ahora llamado Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología). (NCCLS, 2016).

Capítulo 2. Justificación

El trabajo rutinario de hemocultivos en el área de bacteriología requiere de uno o más ciclos de aislamientos e identificación que pueden durar varios días, demorando y dificultando el diagnóstico de padecimientos graves, es por ello la importancia de este trabajo el cual busca reducir tiempos en la identificación de los microorganismos presentes en el hemocultivo y otros líquidos corporales analizados y así otorgar un diagnóstico más rápido y oportuno, además de abatir costos en insumos.

2.1 Hipótesis

Si se implementa una nueva técnica para identificar microorganismos de los hemocultivos positivos y otros líquidos corporales, entonces resultará más eficaz y óptima que la técnica estándar, reduciendo el uso de insumos y materiales, logrando la optimización en costos y en tiempo de diagnóstico.

2.2 Objetivos General

Implementar una nueva estrategia de análisis en el diagnóstico de hemocultivos positivos y otros líquidos corporales, mediante concentración bacteriana para su comparación con la prueba estándar y la optimización de tiempo de diagnóstico.

2.3 Objetivos Particulares

- Implementar una nueva estrategia en el quehacer rutinario del laboratorio en hemocultivos y líquidos diversos.
- Obtener un concentrado bacteriano directamente del hemocultivo positivo y otros líquidos corporales detectados como positivos por el equipo “Versa Trek”.
- Comparar la prueba estándar rutinaria con la nueva estrategia planteada y verificar la verdadera optimización de tiempos.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana de los principales microorganismos en hemocultivos positivos.

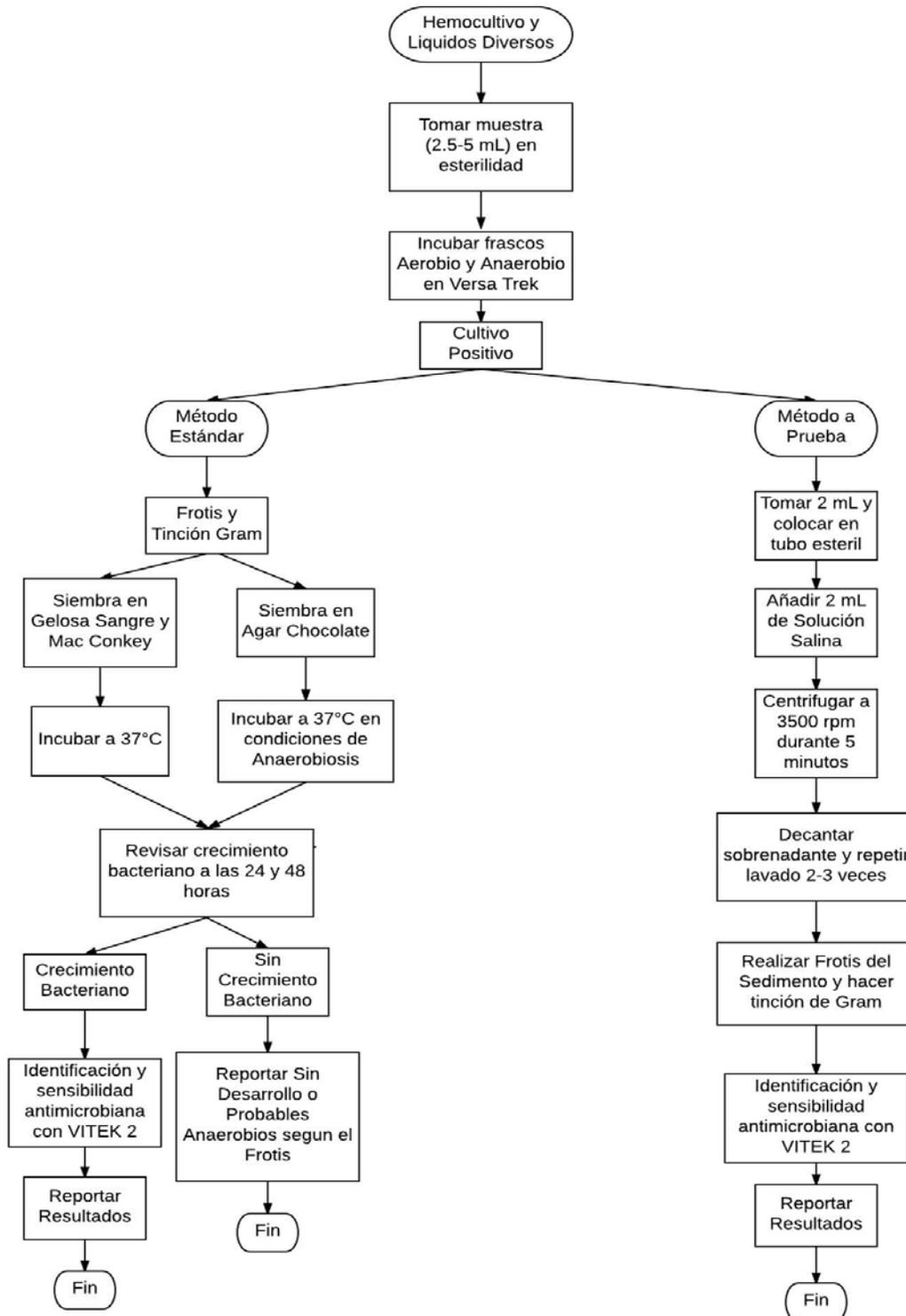
Capítulo 3. Materiales y Métodos

De Febrero a Mayo del año 2016 se ensayaron en forma simultánea y comparativa Hemocultivos y Líquidos diversos referidos como Positivos por el Sistema de Hemocultivo “VersaTrek”, obtenidos en la sección de Microbiología-Bacteriología del Laboratorio Clínico del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Criterios de inclusión: Hemocultivos y Líquidos diversos referidos como Positivos por el Sistema de Hemocultivo “VersaTrek”, que muestren una curva de crecimiento correspondiente al desarrollo de microorganismos, los días lunes, miércoles y jueves del periodo antes mencionado hasta completar 100 muestras.

Criterios de exclusión: Aquellos Hemocultivos y Líquidos diversos referidos como Positivos por el Sistema de Hemocultivo “VersaTrek”, cuya curva de crecimiento no sea correspondiente al desarrollo de microorganismos.

Diagrama de Flujo



Los Hemocultivos y Líquidos diversos fueron tomados en un ambiente estéril por el personal médico y del laboratorio en frascos con medio aerobio y anaerobio, en los cuales se colocó la muestra de 2.5 a 5 mL.

Al llegar las muestras al laboratorio, se incubaron en el sistema de hemocultivo "VersaTrek" por un máximo de 7 días, si el equipo detectó crecimiento de microorganismos en ese lapso, marcó positivo en la pantalla del equipo por lo cual se seleccionaron y se realizó el método estándar seguido en el Laboratorio y el método a probar, para identificación bioquímica y estudios de sensibilidad antimicrobiana, respectivamente.

El método estándar se realizó de la siguiente manera: en condiciones de esterilidad se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra y se realizó un frotis para tinción de Gram, además se sembró en Gelosa Sangre y Mac Conkey, que se incuban a 37°C y Agar Chocolate el cual se incubaba en condiciones de anaerobiosis a 37°C.

Todos los medios se revisaron a las 24 y 48 horas, si se observó crecimiento de algún microorganismo se procedió a la identificación del microorganismo así como la determinación de su sensibilidad antimicrobiana con el sistema "VITEK 2", mediante el uso de tarjetas de identificación, el criterio para la selección del tipo de tarjeta a utilizar fue lo observado en los frotis de la tinción de Gram (GP para bacterias Gram Positivas, GN para bacterias Gram Negativas, ANC para bacterias Anaerobias y YST para levaduras) y de antibiograma (AST-GP para Gram Positivos y AST-GN para Gram Negativos).

Para la identificación en el "Vitek 2" se realizó una suspensión del microorganismo a identificar en tubos con solución salina al 0.45%, dicha suspensión se igualó entre 0.55-0.65 para bacterias y en el caso de levaduras fue al 2.1 de McFarland con ayuda del equipo "DensiChek".

Cuando se tuvo la suspensión se colocó el tubo en el cassette “Smart Carrier Station”, y se procedió a ingresar en el sistema las tarjetas específicas para cada tipo de microorganismo (GP,GN, YST, AST-GP y AST-GN) mediante el uso de un lector de códigos de barras y su posterior ingreso al equipo.

Finalmente el resultado se obtiene y reporta después de 48 a 72 horas después de que el equipo lo detectó como positivo.

El método a probar se realizó de manera simultánea que el método estándar, se tomaron alícuotas de 2 mL de muestra en tubos estériles de 3 x 100 con rosca, se sometieron a 2-3 lavados con solución salina centrifugándolos a 3500 rpm durante 5 minutos, decantando y desechando el sobrenadante entre cada lavado.

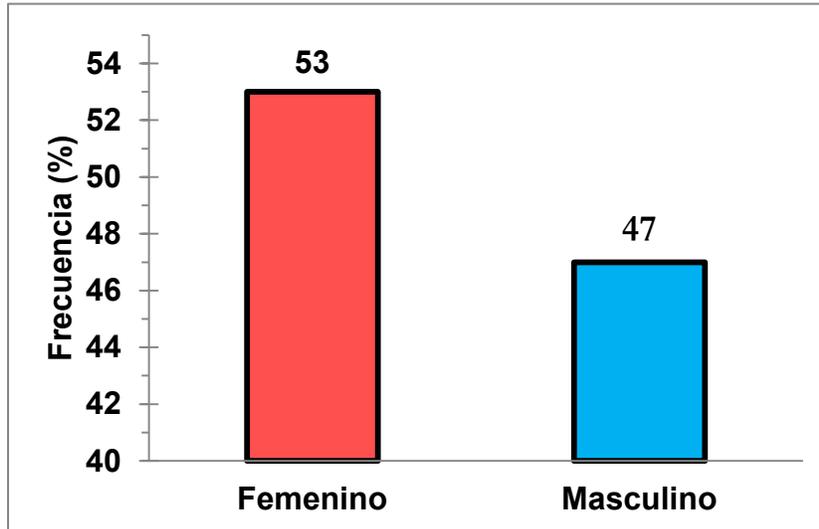
Del sedimento obtenido se realizó un frotis para tinción de Gram, después de observarlo se procedió a la identificación así como la determinación de la sensibilidad antimicrobiana con el sistema “VITEK 2”, mediante el uso de tarjetas de identificación y de antibiograma, del mismo modo anteriormente mencionado.

Finalmente el resultado se obtiene en un intervalo de 12 a 24 horas después de que el equipo lo detectó como positivo.

Se realizaron los controles positivo y negativo, se siguieron ambos procedimientos anteriormente descritos, para el control positivo se inoculó un frasco de hemocultivo con una bacteria conocida (*Staphylococcus aureus*) para determinar si se lograba identificar mediante ambos métodos dicha bacteria. Para el control negativo se trabajó con un frasco de hemocultivo sin bacteria para demostrar que no se obtuviera ninguna bacteria.

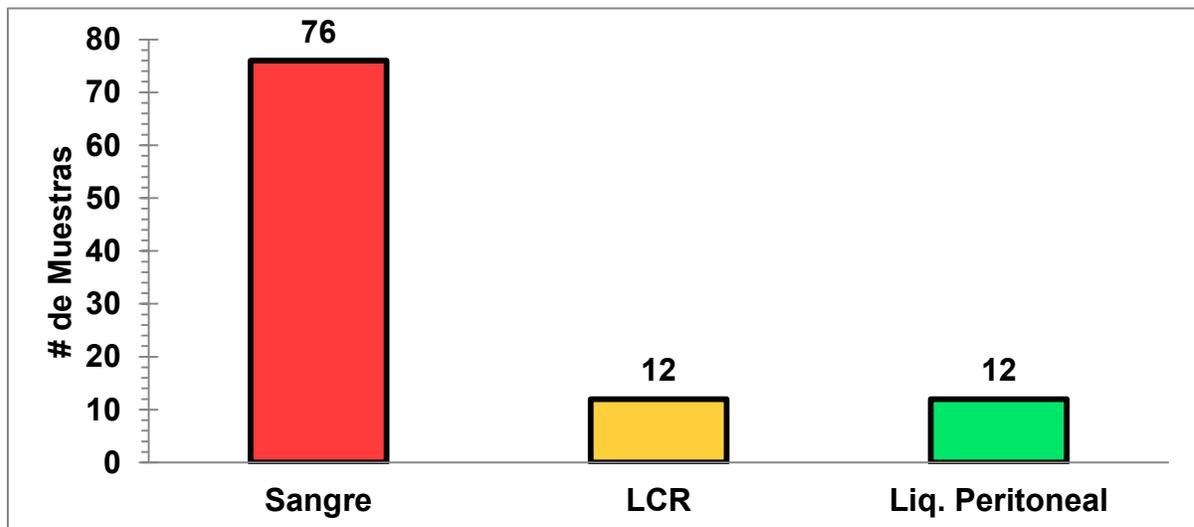
Capítulo 4. Resultados

Se realizó una estadística para determinar la frecuencia (%) de pacientes por género, encontrándose que de un total de 100 pacientes el 53% (53) fueron mujeres y el 47% (47) fueron hombres.



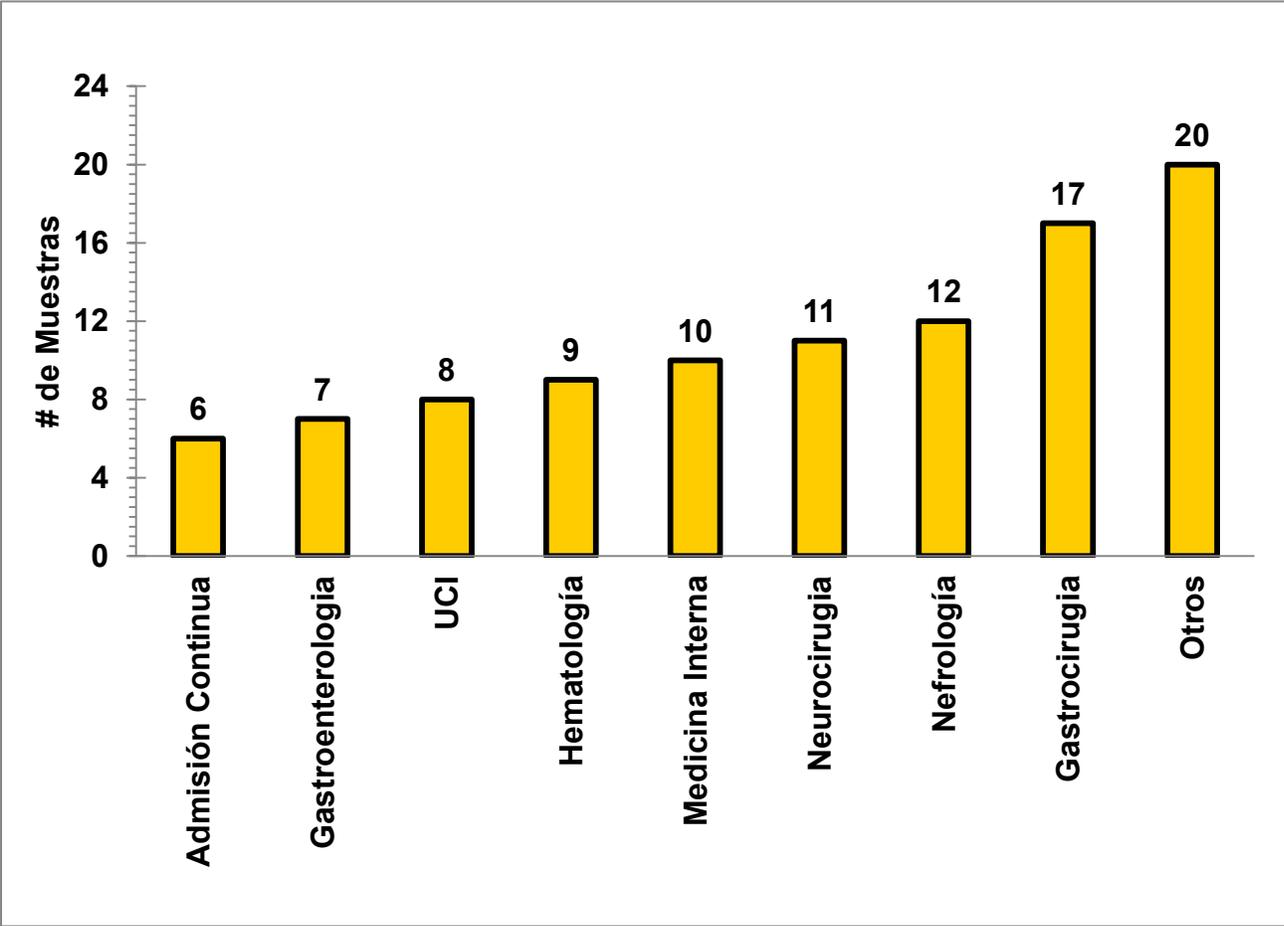
Gráfica 1. Frecuencia de género de sujetos participantes.

Los resultados se agruparon según la muestra utilizada para el hemocultivo, de un total de 100 muestras, 76 eran de sangre, 12 de líquido cefalorraquídeo y 12 de líquido peritoneal.



Gráfica 2. Número de muestras utilizadas en cada hemocultivo.

Los servicios de atención médica del hospital que presentaron mayor números de pacientes con hemocultivos positivos fueron Gastrocirugía, seguido de Nefrología, Neurocirugía, Medicina Interna, Hematología, Unidad de Cuidados Intensivos, Gastroenterología y Admisión continúa, los servicios de atención médica agrupados en otros son Endocrinología, Hemodiálisis, Neurología y Otorrinolaringología.



Gráfica 3. Servicios médicos con mayor positividad de hemocultivos.

Después de la realización de ambas técnicas para la identificación de los microorganismos en hemocultivos se encontraron los siguientes resultados, que se agruparon en una tabla (Tabla 7) donde se muestra el nombre del microorganismo así como el porcentaje de confianza que arroja el equipo a dicha identificación.

Tabla 9. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continúa siguiente hoja).

# Muestra	Método Estándar	% de Probabilidad	Método a Prueba	% de Probabilidad	Concordancia
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus intermedius</i>	95	No
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	98	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	96	Si
3	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Candida albicans</i>	86	Si
4	<i>Burkholderia cepacia</i>	91	<i>Burkholderia cepacia</i>	85	Si
5	<i>Staphylococcus caprae</i>	85	<i>Cryptococcus laurentii</i>	97	No
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	<i>Enterococcus faecalis</i>	98	Si
7	<i>Streptococcus uberis</i>	87	<i>Streptococcus uberis</i>	87	Si
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
9	<i>Escherichia coli</i>	96	<i>Escherichia coli</i>	94	Si
10	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	No
11	<i>Escherichia coli</i>	98	<i>Escherichia coli</i>	98	Si
12	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	95	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	95	Si
13	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	95	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	88	Si
14	<i>Staphylococcus warneri</i>	98	<i>Staphylococcus warneri</i>	97	Si
15	<i>Candida albicans</i>	96	<i>Kocuria kristinae</i>	94	No
16	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	98	Si
17	<i>Staphylococcus aureus</i>	96	<i>Staphylococcus intermedius</i>	91	No
18	<i>Serratia marcescens</i>	95	<i>Serratia marcescens</i>	99	Si
19	<i>Escherichia coli</i>	96	<i>Escherichia coli</i>	93	Si
20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	93	Si
22	Contaminada	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	No

Tabla 10. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# Muestra	Método Estándar	% de Probabilidad	Método a Prueba	% de Probabilidad	Concordancia
23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
24	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
25	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	94	No
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Raoultella planticola</i>	93	No
27	Bacilos + Probables Anaerobios	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	96	No
28	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	-	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	99	No
29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	Si
30	<i>Escherichia coli</i>	99	<i>Escherichia coli</i>	96	Si
31	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	90	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	87	Si
32	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	99	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	99	Si
33	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	94	No
34	<i>Candida albicans</i>	97	<i>Candida albicans</i>	90	Si
35	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Candida albicans</i>	98	Si
36	<i>Staphylococcus aureus</i>	94	<i>Staphylococcus aureus</i>	89	Si
37	<i>Staphylococcus aureus</i>	96	<i>Staphylococcus aureus</i>	95	Si
38	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95	Si
39	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	<i>Streptococcus mitis/ Streptococcus oralis</i>	89	No
40	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	Si
41	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	Si
42	<i>Staphylococcus aureus</i>	92	<i>Staphylococcus aureus</i>	93	Si

Tabla 11. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# Muestra	Método Estándar	% de Probabilidad	Método a Prueba	% de Probabilidad	Concordancia
43	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	98	Si
44	Sin Desarrollo	-	<i>Streptococcus thoraltensis</i>	93	No
45	<i>Escherichia coli</i>	96	<i>Escherichia coli</i>	94	Si
46	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	90	Si
47	<i>Staphylococcus epidermidis</i> / <i>Staphylococcus aureus</i>	99/95	<i>Staphylococcus intermedius</i>	93	No
48	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Cryptococcus laurentii</i>	86	No
49	Bacilos + Probables Anaerobios	-	<i>Propionibacterium granulosum</i>	-	No
50	<i>Streptococcus mitis</i> / <i>Streptococcus oralis</i>	97	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	No
51	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptococcus laurentii</i>	90	No
52	<i>Candida albicans</i>	97	<i>Stephanoascus ciferrii</i>	86	No
53	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99	<i>Streptococcus mutans</i>	88	No
54	Bacilos + Probables Anaerobios	-	Probables Anaerobios	-	Si
55	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	Si
56	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	89	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	Si
57	Flora No Patogena	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	No
58	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	93	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
59	<i>Staphylococcus warneri</i>	89	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	96	No
60	<i>Candida albicans</i>	99	<i>Trichosporon asahii</i>	85	No
61	<i>Streptococcus mitis</i> / <i>Streptococcus oralis</i>	93	<i>Granulicatella adiacens</i>	93	No
62	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
63	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	94	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	89	Si

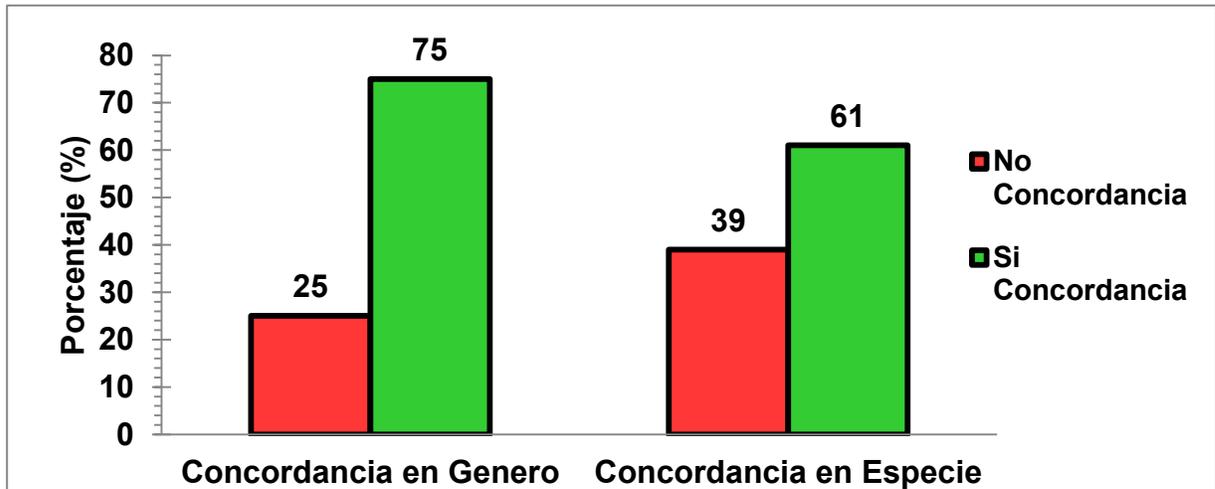
Tabla 12. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# Muestra	Método Estándar	% de Probabilidad	Método a Prueba	% de Probabilidad	Concordancia
64	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	98	Si
65	Cocos + Probables Anaerobios	-	<i>Kocuria rosea</i>	98	No
66	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	91	No
67	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	Si
68	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	89	Si
69	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	99	Si
70	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	99	Si
71	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	Si
72	<i>Escherichia coli</i>	99	<i>Escherichia coli</i>	99	Si
73	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99	Si
74	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99	<i>Escherichia coli</i>	97	No
75	<i>Staphylococcus intermedius</i>	99	<i>Kocuria rosea</i>	98	No
76	<i>Staphylococcus intermedius</i>	99	<i>Staphylococcus aureus</i>	91	No
77	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
78	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	99	Si
79	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	97	Si
80	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>	95	No
81	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
82	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99	Si
83	<i>Staphylococcus capitis</i>	96	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	95	No
84	Sin Desarrollo	-	Probables Anaerobios	-	No
85	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97	Si

Tabla 13. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

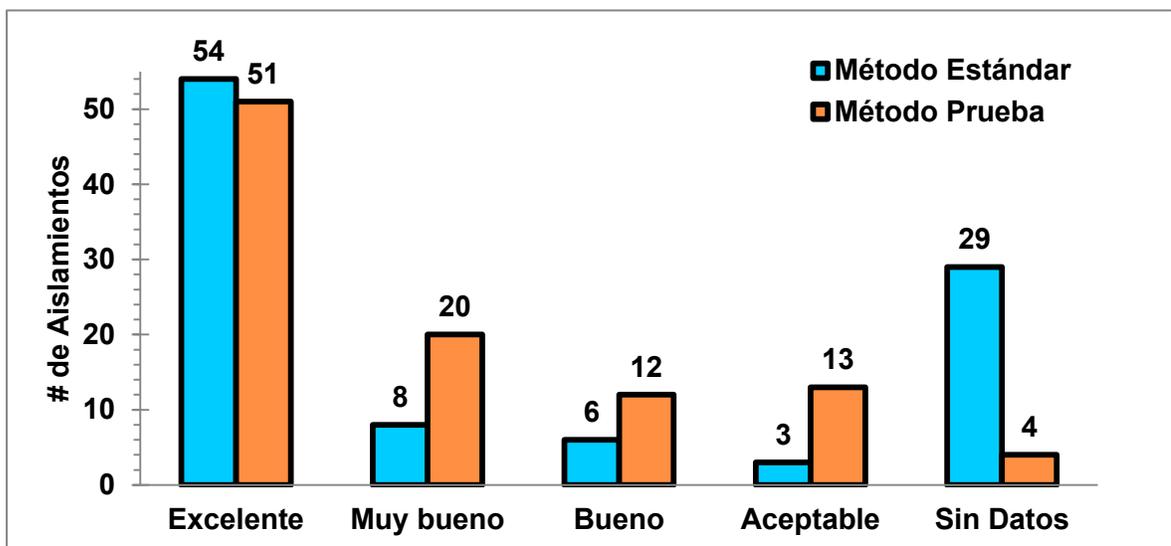
# Muestra	Método Estándar	% de Probabilidad	Método a Prueba	% de Probabilidad	Concordancia
86	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	<i>Staphylococcus lentus</i>	91	No
87	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98	Si
88	<i>Staphylococcus intermedius</i>	86	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	94	No
89	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	99	Si
90	<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	96	Si
91	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Rhodotorula glutinis/mucilaginosa</i>	86	No
92	<i>Escherichia coli</i>	96	<i>Escherichia coli</i>	96	Si
93	<i>Escherichia coli</i>	96	<i>Escherichia coli</i>	99	Si
94	<i>Enterococcus hirae/Staphylococcus epidermidis</i>	95/93	<i>Enterococcus gallinarum</i>	90	No
95	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	90	<i>Streptococcus anginosus</i>	86	No
96	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96	Si
97	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Burkholderia cepacia group</i>	86	No
98	Sin Desarrollo	-	Sin Desarrollo	-	Si
99	<i>Escherichia coli</i>	95	<i>Escherichia coli</i>	86	Si
100	Bacilos + Probables Anaerobios	-	<i>Serratia fircaria</i>	93	No

Se compararon los resultados obtenidos de cada método para ver el porcentaje de concordancia que presentaba el método prueba con el método estándar, se encontró que a nivel de género hay un 75% de concordancia y un 25% de no concordancia, mientras que a nivel de especie se observó un 61% de concordancia y el 39% no.



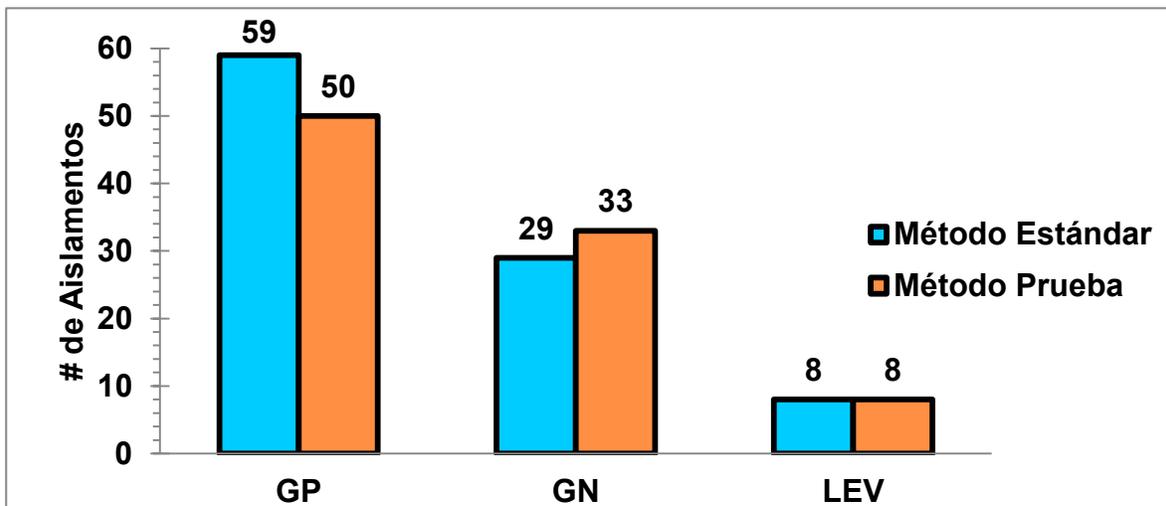
Gráfica 4. Porcentaje de concordancia de identificación entre ambos métodos.

Además, se compararon los niveles de confianza de las identificaciones entre el método prueba y el método estándar, los resultados se muestran en la siguiente gráfica. Cabe resaltar que se encontraron resultados que no arrojaron datos acerca del nivel de confianza estos resultados se muestran como sin datos.



Gráfica 5. Nivel de confianza de identificación de cada método utilizado para su identificación.

Los microorganismos identificados se agruparon según su tinción de Gram, en Gram Positivos (GP), Gram Negativos (GN) y Levaduras (LEV), encontrando que en ambos metodos son mas comunes las GP, seguidas de GN y finalmente LEV.



Gráfica 6. Microorganismos agrupados por tinción de Gram según el método utilizado para su identificación.

En la siguiente imagen se puede observar un frotis tinción de Gram con una bacteria Gram Positiva identificada como *Staphylococcus aureus*, dicho frotis pertenece la muestra 16 obtenida de un hemocultivo.

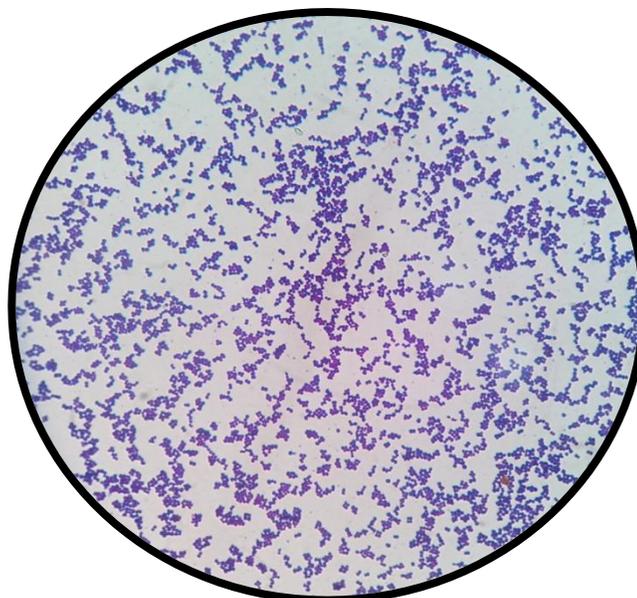


Figura 15. *Staphylococcus aureus* Tinción Gram 100x

En este frotis de la muestra 9 obtenida de un Hemocultivo se observa una bacteria Gram Negativa, identificada como *Escherichia coli*.

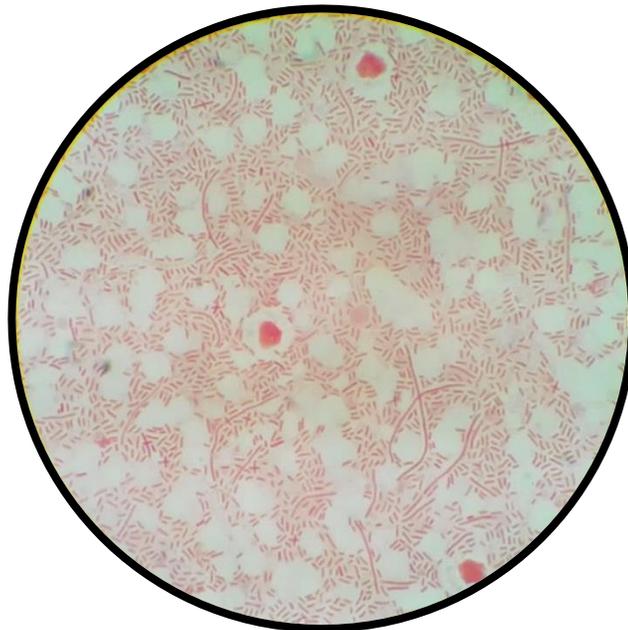


Figura 16. *Escherichia coli* Tinción Gram 100x.

Finalmente el siguiente frotis muestra una Levadura identificada como *Candida albicans*, de la muestra 34 obtenida de un hemocultivo.

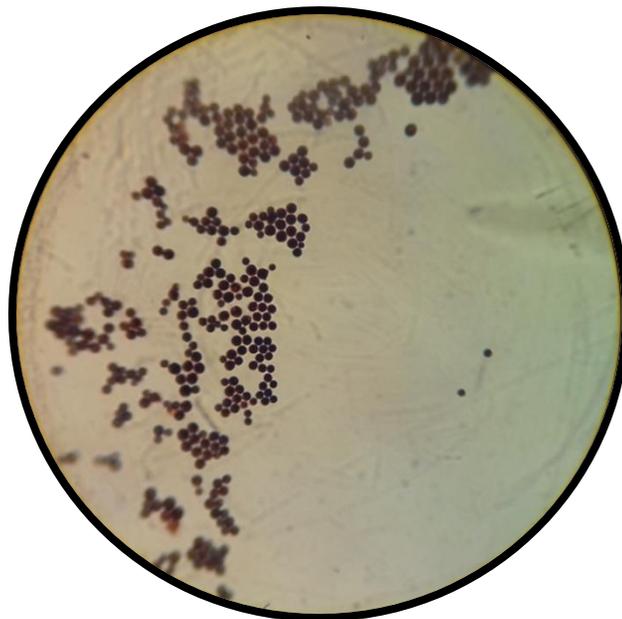
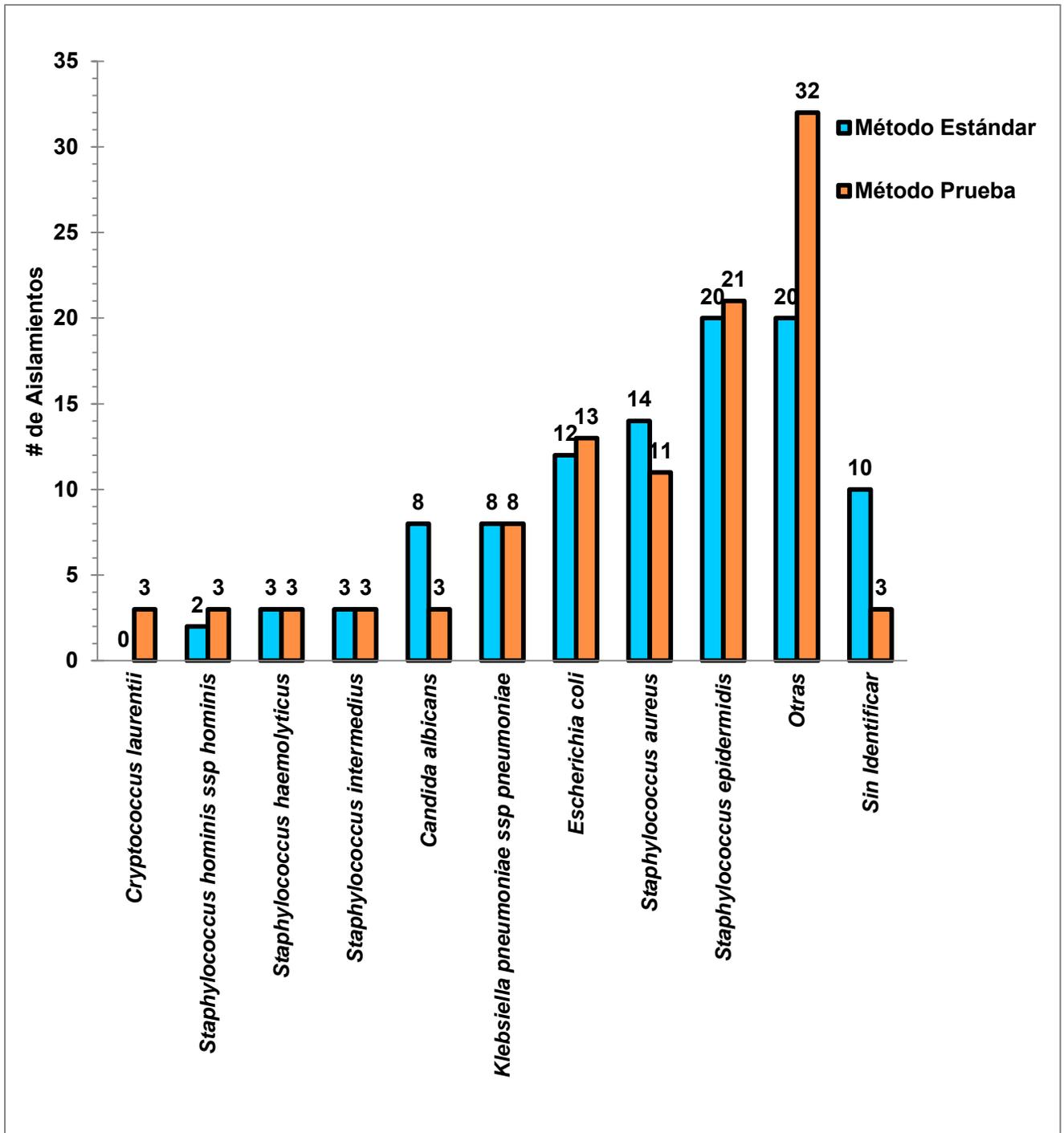


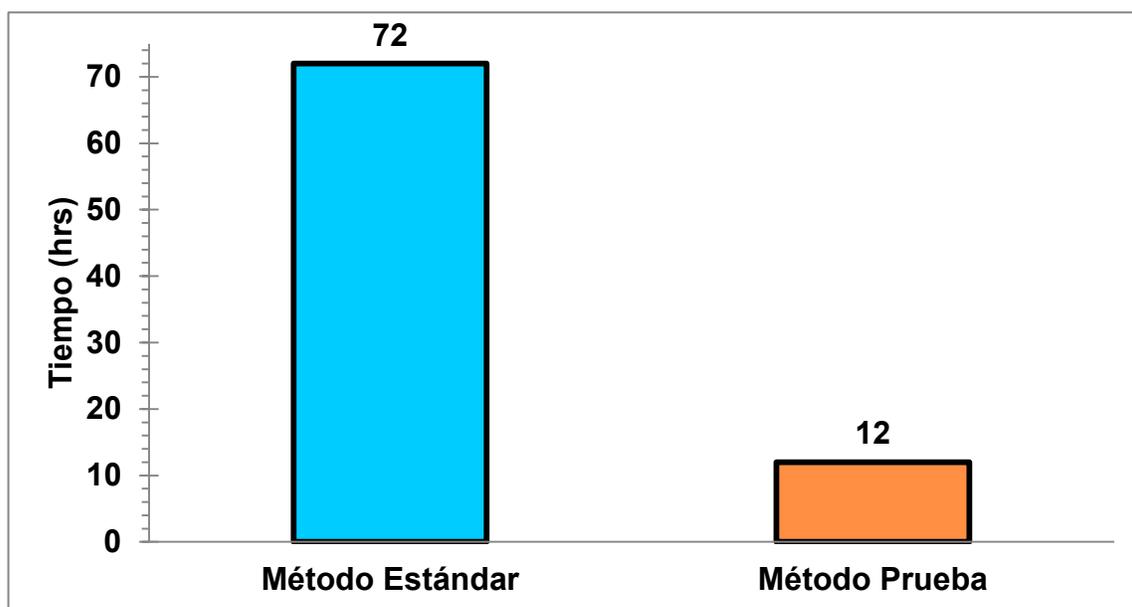
Figura 17. *Candida albicans* Tinción Gram 100x.

La siguiente gráfica muestra a los microorganismos más aislados agrupados por el método utilizado se señalan en la siguiente gráfica.



Gráfica 7. Microorganismos más aislados agrupados por método utilizado para su identificación.

Finalmente se comparó el tiempo de identificación entre ambos métodos obteniendo que por el método estándar se llega a un resultado a las 72 horas de que el equipo detecta como positivo al hemocultivo, y en el método a prueba se logra identificar al microorganismo a las 12 horas de ser detectado como positivo, esto es una reducción de tiempo de 83.3%.



Gráfica 8. Tiempo de identificación por método.

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana solo se analizaron 4 microorganismos de los más aislados siendo estos: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae*; a pesar de ser uno de los microorganismos más frecuentes no se determinó el perfil de resistencia de *Candida albicans* debido a que el sistema “Vitek 2” no presenta tarjeta de antibiograma para levaduras.

En las siguientes tablas se muestran en **azul** los resultados obtenidos con el microorganismo identificado mediante el **método estándar** y en **naranja** los obtenidos con el microorganismo identificado por el **método prueba**, además se muestra la concordancia entre los resultados que se presentaron principalmente de Sensibilidad (S), Intermedio (I) y Resistencia (R) según hayan sido la mayoría.

Para el microorganismo *Staphylococcus epidermidis* se tuvo una n=20 con el método estándar y una n=21 con el método prueba, sin embargo, una prueba fue invalidada (así fue reportada por el equipo) por lo cual solo se presentan 20 resultados en el método prueba. Solo tres antibióticos no concordaron entre sí.

Tabla 14. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana para *Staphylococcus epidermidis*.

Antibiótico	S	I	R	Total	S	I	R	Total	Coincidencia
Ciprofloxacino	8	2	<u>10</u>	20	6	4	<u>10</u>	20	Si
Clindamicina	<u>12</u>	1	7	20	<u>12</u>		8	20	Si
Eritromicina	<u>10</u>		<u>10</u>	20	9		<u>11</u>	20	Parcialmente
Gentamicina	<u>10</u>	1	9	20	<u>9</u>	2	<u>9</u>	20	Parcialmente
Levofloxacino	<u>8</u>	5	7	20	6	5	<u>9</u>	20	No
Linezolid	<u>20</u>			20	<u>19</u>		1	20	Si
Moxifloxacino	<u>14</u>	3	3	20	<u>14</u>	2	4	20	Si
Nitrofurantoína	<u>20</u>			20	<u>20</u>			20	Si
Oxacilina	4		<u>16</u>	20	5		<u>15</u>	20	Si
Quinupristina/Dalfopristina	<u>20</u>			20	<u>19</u>		1	20	Si
Rifampicina	<u>20</u>			20	<u>20</u>			20	Si
Tetraciclina	<u>16</u>		4	20	<u>14</u>		6	20	Si
Tigeciclina	<u>20</u>			20	<u>20</u>			20	Si
Vancomicina	<u>20</u>			20	<u>18</u>		2	20	Si

Staphylococcus aureus tuvo una n=14 con el método estándar y una n=11 con el método prueba, en este caso se tuvo una concordancia en cada antibiótico.

Tabla 15. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*.

Antibiótico	S	I	R	Total	S	I	R	Total	Coincidencia
Ciprofloxacino	4		<u>10</u>	14	2		<u>9</u>	11	Si
Clindamicina	2		<u>12</u>	14	1		<u>10</u>	11	Si
Eritromicina	2		<u>12</u>	14			<u>11</u>	11	Si
Gentamicina	<u>14</u>			14	<u>11</u>			11	Si
Levofloxacino	4	1	<u>9</u>	14	2	4	<u>5</u>	11	Si
Linezolid	<u>14</u>			14	<u>11</u>			11	Si
Moxifloxacino	<u>8</u>	3	3	14	<u>6</u>	5		11	Si
Nitrofurantoína	<u>13</u>	1		14	<u>10</u>	1		11	Si
Oxacilina	5		<u>9</u>	14	3		<u>8</u>	11	Si
Quinupristina/Dalfopristina	<u>14</u>			14	<u>11</u>			11	Si
Rifampicina	<u>14</u>			14	<u>10</u>		1	11	Si
Tetraciclina	<u>14</u>			14	<u>11</u>			11	Si
Tigeciclina	<u>14</u>			14	<u>11</u>			11	Si
Vancomicina	<u>14</u>			14	<u>7</u>		4	11	Si

Escherichia coli presentó una n=12 con el método estándar y una n=13 con el método prueba, a excepción del antibiótico Piperacilina/Tazobactam, el resto de los antibióticos tuvieron concordancia.

Tabla 16. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana para *Escherichia coli*.

Antibiótico	S	I	R	Total	S	I	R	Total	Coincidencia
Amikacina	<u>12</u>			12	<u>13</u>			13	Si
Ampicilina	1		<u>11</u>	12	2		<u>11</u>	13	Si
Ampicilina/Sulbactam	1	1	<u>10</u>	12	2	1	<u>10</u>	13	Si
Aztreonam	4		<u>8</u>	12	4		<u>9</u>	13	Si
Cefazolina	3		<u>9</u>	12	3		<u>10</u>	13	Si
Cefepima	5		<u>7</u>	12	5		<u>8</u>	13	Si
Ceftriaxona	4		<u>8</u>	12	4		<u>9</u>	13	Si
Ciprofloxacino	3		<u>9</u>	12	3		<u>10</u>	13	Si
Gentamicina	<u>9</u>		3	12	<u>7</u>		6	13	Si
Meropenem	<u>12</u>			12	<u>12</u>		1	13	Si
Nitrofurantoína	<u>11</u>	1		12	<u>12</u>	1		13	Si
Piperacilina/Tazobactam	<u>6</u>	2	4	12	<u>6</u>	1	<u>6</u>	13	Parcialmente
Tigeciclina	<u>12</u>			12	<u>13</u>			13	Si
Tobramicina	5		<u>7</u>	12	6		<u>7</u>	13	Si
Trimetoprima/Sulfametoxazol	4		<u>8</u>	12	3		<u>10</u>	13	Si

Finalmente, *Klebsiella pneumoniae* tuvo una n=8 en ambos métodos, y fue el microorganismo que menos concordancia presentó.

Tabla 17. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana para *Klebsiella pneumoniae*.

Antibiótico	S	I	R	Total	S	I	R	Total	Coincidencia
Amikacina	<u>8</u>			8	<u>8</u>			8	Si
Ampicilina			<u>8</u>	8			<u>8</u>	8	Si
Ampicilina/Sulbactam	3	1	<u>4</u>	8	2	<u>3</u>	<u>3</u>	8	Parcialmente
Aztreonam	3		<u>5</u>	8	2		<u>6</u>	8	Si
Cefazolina	3		<u>5</u>	8	2		<u>6</u>	8	Si
Cefepima	<u>4</u>		<u>4</u>	8	2		<u>6</u>	8	Parcialmente
Ceftriaxona	3		<u>5</u>	8	2		<u>6</u>	8	Si
Ciprofloxacino	<u>5</u>	4		9	<u>7</u>	1		8	Si
Gentamicina	<u>5</u>		3	8	3		<u>5</u>	8	No
Meropenem	<u>8</u>			8	<u>8</u>			8	Si
Nitrofurantoína	3	<u>5</u>		8	<u>6</u>	2		8	No
Piperacilina/Tazobactam	<u>7</u>	1		8	<u>7</u>	1		8	Si
Tigeciclina	<u>8</u>			8	<u>8</u>			8	Si
Tobramicina	<u>4</u>		<u>4</u>	8	3		<u>5</u>	8	Parcialmente
Trimetoprima/Sulfametoxazol	3		<u>5</u>	8	2		<u>6</u>	8	Si

Capítulo 5. Discusión de Resultados

Las bacteriemias están asociadas a una alta mortalidad, un largo tiempo de estadía hospitalaria y, por consiguiente, a un aumento de los costos. La identificación del microorganismo seguida de la prueba de sensibilidad de manera prematura permitiría una elección de fármacos de menor espectro, dosis adecuadas, así como mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad del paciente con bacteriemias, por ello se realizó este estudio, para buscar una disminución del tiempo de emisión de resultados con una nueva técnica que nos conduzca a una identificación fiable del microorganismo aislado.

Lo que respecta a los microorganismos aislados se observó que los encontrados con mayor frecuencia pertenecen al grupo de los Gram positivos, seguidos por Gram Negativos y en menor número las Levaduras, esto coincide con un estudio realizado en una Unidad Hospitalaria de Colombia (Florez, 2006).

Los resultados ponen de manifiesto que los microorganismos principalmente aislados por ambas técnicas son *Staphylococcus epidermidis*, seguido de *Staphylococcus aureus*, estos datos concuerdan con la mayoría de los estudios encontrados, tales como (Montejo 2002, Chang, 2008, Pien 2010, Sánchez 2010, Ramírez 2015), Juan Ayala menciona en su estudio “Bacteremias: incidencia y resistencia antimicrobiana, tendencia a través de 15 años de seguimiento” del 2006 que “Es probable que ambos se relacionen con el uso prolongado de catéteres vasculares, antibióticos, etc., sin embargo aunque los hemocultivos se realizan a pacientes con fiebres o con sospecha de un episodio infeccioso de acuerdo al médico tratante, no se puede descartar la contaminación, debido a que muchos casos la muestra se tomó a través del catéter”.

Los siguientes microorganismos más aislados pertenecen al grupo de los Gram negativos; *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, coincidiendo con Cortéz 2012 y Adrianzén quien además en 2013 atribuye una alta mortalidad por bacteriemias producidas por estos microorganismos conocidas por su rol patógeno en infecciones intrahospitalarias.

Llama la atención que *Candida albicans* figure entre los microorganismos más aislados ocupando el quinto lugar, lo cual es relevante porque se ha reportado que algunas especies de levaduras aisladas de hemocultivos son un factor importante en el incremento de infecciones intrahospitalarias en la actualidad y tienen resistencia intrínseca a grupos específicos de antimicóticos, lo cual ha sido relacionado con el uso de antibióticos de amplio espectro. (Sánchez, 2010).

Con respecto a la técnica prueba que busca optimizar tiempos, no es la primera vez que se realizan estudios para evaluar el rendimiento del sistema "Vitek 2" en la identificación y sensibilidad antimicrobiana partiendo directamente de las botellas de hemocultivo; uno fue De Cueto en "Uso de Hemocultivos para la identificación y pruebas de susceptibilidad directa con el Sistema Vitek 2.", donde obtuvo una correcta identificación en el 62% de los aislamientos, 28% no fueron identificados y 10% fueron mal identificados. En este estudio, se analizó la concordancia entre las identificaciones, así como los niveles de confianzas de las mismas, a pesar de que el nivel de concordancia (75-61%) entre las identificaciones no es tan elevado, el nivel de confianza resulta muy cercano entre la técnica a probar (51%) que en la técnica estándar (54%), esto se atribuye a diversos factores, primero es la pureza del microorganismo, el hecho de que el método estándar tiene la certeza que el microorganismo está totalmente puro a la hora de identificar, mientras que el método prueba presenta una desventaja dado que solo con la ayuda de una tinción de Gram puede intuirse si se tiene uno o más microorganismos.

Otro factor que modifica la concordancia y el nivel de confianza de la identificación, es la realización e interpretación correcta de la tinción de Gram, pues como se mencionó en la introducción a partir del conocimiento del grupo al que pertenece (Gram Positivas, Gram Negativas y Levaduras) será el tipo de tarjeta reactiva que se utilizará, por lo cual si se confunde una Levadura con un Gram Positivo las pruebas que el Sistema "Vitek 2" realizaría no serían las adecuadas para lograr una buena identificación, sin embargo, al contar con una base de datos dentro de su sistema el equipo arrojaría como resultado el nombre de un microorganismo con resultados de pruebas "cercanas".

Respecto a la determinación de la sensibilidad con el método estándar se encontró que *Staphylococcus epidermidis* es resistente a Ciprofloxacino y Oxacilina, sensible a Clindamicina, Gentamicina, Levofloxacino, Linezolid, Moxifloxacino, Nitrofurantoína, Quinupristina/Dalfopristina, Rifampicina, Tetraciclina, Tigeciclina, y Vancomicina, mientras que para Eritromicina presentó el mismo número de resultados para resistencia y sensibilidad.

Mediante el método prueba se encontró que *Staphylococcus epidermidis* es resistente a Ciprofloxacino, Eritromicina, Levofloxacino y Oxacilina, sensible a Clindamicina, Linezolid, Moxifloxacino, Nitrofurantoína, Quinupristina/Dalfopristina, Rifampicina, Tetraciclina, Tigeciclina, y Vancomicina, en el caso de Gentamicina presento el mismo número de resultados para resistencia y sensibilidad.

Staphylococcus aureus tuvo una concordancia entre ambos métodos, presentando resistencia a Ciprofloxacino, Clindamicina, Eritromicina, Levofloxacino y Oxacilina, y es sensible a Gentamicina, Linezolid, Nitrofurantoína, Quinupristina/Dalfopristina, Rifampicina, Tetraciclina, Tigeciclina, y Vancomicina con ambos métodos.

En *Escherichia coli*, se encontró una concordancia entre ambos métodos, presentando resistencia a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefazolina, Cefepima, Ceftriaxona, Ciprofloxacino, Tobramicina y Trimetoprima/Sulfametoxazol, y es sensible a Amikacina, Gentamicina, Meropenem, Nitrofurantoina y Tigeciclina, en lo que respecta al antibiótico Piperacilina/Tazobactam presenta sensibilidad en el método estándar y para el método a prueba presenta sensibilidad y resistencia con el mismo número de resultados.

Finalmente, *Klebsiella pneumoniae* presentó con el método estándar resistencia a Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefazolina, Ceftriaxona y Trimetoprima/Sulfametoxazol, es sensible a Amikacina, Ciprofloxacino, Gentamicina, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam y Tigeciclina, es intermedio para Nitrofurantoina y presenta el mismo número de resultados para resistencia y sensibilidad con Cefepima, y Tobramicina. Mediante el método a prueba presenta resistencia a Ampicilina, Aztreonam, Cefazolina, Cefepima, Ceftriaxona, Gentamicina, Tobramicina y Trimetoprima/Sulfametoxazol, y es sensible para Amikacina, Ciprofloxacino, Meropenem, Nitrofurantoina, Piperacilina/Tazobactam y Tigeciclina, mientras que para Ampicilina/Sulbactam presentó el mismo número de resultados de intermedio y resistencia.

Dichos resultados concuerdan en su mayoría con lo reportado por Paz en un estudio realizado en Zulia, Venezuela, del 2015 y Ramírez en “Frecuencia y perfil de susceptibilidad de los aislamientos obtenidos a partir de hemocultivos en un centro hospitalario de tercer nivel” del 2015.

Al comparar los resultados de sensibilidad antimicrobiana obtenidos con el método estándar y el método prueba, se puede observar mínimas discordancias, una probable causa es que puede que las cepas bacterianas tienen la capacidad de ir cambiando sus características fenotípicas entre cada pase o siembra, (Iáñez, 1998), lo cual se puede ajustar a lo sucedido ya que con la metodología estándar el microorganismo sufre entre 1-3 pases y dichos pases sufren los cambios ya mencionados lo cual justifica la discordancia en el antibiograma, así como en el nivel de confianza de identificación. Además, cabe recordar la pureza de los microorganismos con las que cuenta el método estándar comparado con el método prueba, el cual no tiene esa certeza.

Para finalizar se ha comprobado que el acortar el tiempo de respuesta en los estudios de susceptibilidad in vitro permite un inicio o un cambio más oportuno de la terapia antimicrobiana, lo que conlleva a una reducción en el número de exámenes, reducción en los días de hospitalización, reducción en el uso de antimicrobianos y se traduce además en una importante reducción de los costos totales.

Capítulo 6. Conclusiones

- Se obtuvo un concentrado bacteriano directo del frasco de hemocultivos y líquidos corporales detectados como positivos por el equipo “Versa Trek”.
- Se comparó la técnica de rutina y la nueva estrategia y de igual forma se verificó la verdadera optimización de los tiempos.
- De igual forma se determinó la sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados en hemocultivos positivos.
- También se logró implementar una nueva estrategia en el quehacer rutinario del laboratorio en el procesamiento de hemocultivos y líquidos diversos.

Capítulo 7. Referencias

Adrianzén, D. (2013). Mortalidad por bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* productoras de beta lactamasas de espectro extendido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 30:18-25.

Ángel, G. (2006). Interpretación clínica del laboratorio. (7ª ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Ayala, J. (2006). Bacteremias: incidencia y resistencia antimicrobiana, tendencia a través de 15 años de seguimiento. *Revista Medicina Interna México*. 22: 263-268.

BioMérieux (2006). Vitek 2. [En línea]. Consultado el 21 de Agosto del 2016. Recuperado de: <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admin/tablas/productos/Vitek%202%20Compact.pdf>.

Chang, D. (2008). Perfil de resistencia de las bacterias aisladas de hemocultivos en un Hospital General. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 21: 62-65.

Cisneros, J. (2003). Acinetobacter baumannii: un patógeno nosocomial de difícil control. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21: 221-223.

Cortéz, D. (2012). Bacteriemia en pacientes oncológicos. Experiencia en un hospital pediátrico. *Revista Chilena de Infectología*; 29: 164-168.

Cueto, M. (2007). El hemocultivo pediátrico: indicaciones y técnica. *Revista Anales de Pediatría Continuada*. 5:279-82.

Florez, L. (2006). Perfil microbiológico de aislamientos de hemocultivos en pacientes atendidos en los diferentes servicios de la empresa social del estado Francisco de Paula Santander en Bucaramanga. Colombia: Universidad De Pamplona.

Forbes, B. (2009). Diagnostico Microbiológico. (12ª ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.

García, P. (2015). Hemocultivos. Pontificia Universidad Católica de Chile.

González, S.; Torales, T. (2011). Infectología Clínica Pediátrica. (8ª ed.). México: Mc Graw Hill.

Herrera, A. (2010). Aislamiento de microorganismos patógenos en hemocultivos en la unidad de cuidados intensivos de neonatología. *Revista Medicentro*. 14: 110-112.

Hurtado, M. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 22: 112-118.

Iguchi, A., Thomson, N., Ogura, Y., Saunders, D., Henderson, I., & Harris, D. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology*, 1: 347-54.

Iáñez, E. (1998). Demostración de la espontaneidad de las mutaciones bacterianas. [En línea] Consultado el 22 de noviembre del 2016. Recuperado de: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/23_micro.htm

Ingraham, J. (1998). Introducción a la microbiología. Barcelona. Reverté.

Koneman, E. (2008). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas En Color. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Lopéz, J. (2009). *Klebsiella pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Revista Iatreia*, 23: 157-165

López, K. (2013). Prevalencia de Positividad de Hemocultivos y Frecuencia de Microorganismos Aislados en el Hospital Pediátrico de Sinaloa de Febrero del 2012 a Febrero del 2013. Licenciatura. Universidad Autónoma De Sinaloa.

Loza, E. (2003). Hemocultivos. [En línea] Consultado el 05 de Agosto del 2016. Recuperado de: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>

Luján, D. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 48: 465-474.

Montejo, M. (2002). Bacteriemia y fungemia nosocomial en adultos en un hospital terciario: Estudio de un año. *Gaceta Médica de Bilbao*. 99: 100-103.

Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Colombia: Universidad de Antioquia.

NCCLS. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (26^a ed.) [En línea]. Consultado el 20 de Agosto del 2016. Recuperado de: ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf

Ochoa, A. (2013). Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 70: 138-50.

Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 555-567.

Paz, A. (2015). Incidencia de microorganismos en hemocultivos procesados en un hospital del estado Zulia y su resistencia a los agentes antimicrobianos. *Revista Kasmera*. 43: 16-33.

Pien, B. (2010). The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Revista The American Journal of Medicine*. 123: 819-828.

Pemán, J., Martín, E., & Rubio, M. (2007). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica España: Revista Iberoamericana de Micología.

Prats, G. (2006). Microbiología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Ramírez, A. (2015) Frecuencia y perfil de susceptibilidad de los aislamientos obtenidos a partir de hemocultivos en un centro hospitalario de tercer nivel. *Gaceta Médica de México*. 60: 255-260.

Ross, P. (2012). Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular (6^a ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana

Rodríguez, F. (2012). Positive blood cultures in a pediatric emergency department: a descriptive analysis. *Emergencias*. 24: 386-388.

Sánchez R. (2010). Frecuencia de microorganismos aislados de hemocultivos en un hospital de tercer nivel en el estado de Chiapas. *Revista Enfermedades infecciosas y microbiología*. 30: 53-58.

Shimabuku, A. (2004). Etiología y susceptibilidad antimicrobiana de las infecciones neonatales. *Revista de la Facultad de Medicina*. 65:19-24.

Strasinger, S. (2008). Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. (5^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Sirijan, S. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016: 208-216.

Strasinger, S. (2008). Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. (5^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Taroco, R., (s.f). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. [En línea]. Consultado el 20 de Agosto del 2016. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

Thermo Fisher Scientific Inc (2011). Sistema automatizado de detección microbiana Thermo Scientific VersaTREK. [En línea]. Consultado el 20 de Agosto del 2016. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Catalogs%20&%20Brochures/Microbiology/Clinical/culturesystems/VersaTREK-Brochure-ES.pdf>

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.

Vera, G. (2004). Introducción a la Microbiología. Costa Rica: EUNED.

Villar, M. (2014). Epidemiologic and Clinical Impact of Acinetobacter baumannii Colonization and Infection. *Medicina*. 95: 202-210.

Zuñiga, A. (2010). Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en Acinetobacter baumannii. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 14: 148-162.