



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"ESTUDIO INVITRO DE LAS BOTELLAS FAN AEROBIOS Y ANAEROBIOS, UTILIZADAS PARA LA RECUPERACION DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE SEPTICEMIAS O BACTEREMIAS MEDIANTE EL SISTEMA DE DETECCION MICROBIANA BACT/ALERT".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ROSAURA ARELLANO RAMIREZ

ASESORES. OFI ANDREA BECERRIL CSNAYA
M.C. RAFAEL GARCIA GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2062

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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 LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Q. MA. DEL CARMEN GARCÍA MIJARES
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

*Estudio invitro de las botellas FAN aerobios y anaerobios, utilizadas para
la recuperación de microorganismos causantes de septicemias o bacteremias
mediante el sistema de detección microbiana BACI/ALFRI*

que presenta la pasante: Rosaura Arellano Ramirez
con número de cuenta: AR1914-9 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán local, Edo. de Mex., a 11 de junio del 2001.

PRESIDENTE	<u>H.V.J. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea A. Becerra Osaya</u>	
SECRETARIO	<u>Qra. Susana F. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma. de Jesús Rodríguez Cadena</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.B.P. Aspero Landa de Orozco</u>	

AGRADECIMIENTOS:

A MIS PADRES ANDREA Y JOSE : Por el gran esfuerzo realizado así como su apoyo, paciencia, y comprensión para la realización del presente trabajo.

A MIS HERMANOS EVA, MANUEL Y ESTEBAN : Por la paciencia, animos que siempre me han brindado para la culminación de la tesis como punto final de la carrera. Pero sobre todo a **JORGE(†)** por el poco tiempo que la vida nos permitió compartir juntos a todos.

A RAFAEL MARTINEZ U. Por su ayuda para la realización escrita de está tesis.

A: EL DR. RAFAEL GARCIA GONZALEZ . Por haberme ayudado a dar un paso más en mi vida profesional , brindándome animos para seguir adelante, así como apoyo en todo lo académico y sobre todo la enseñanza que uno espera de todo profesor a el muchas gracias.

A la Q.F.I. ANDREA BECERRIL OSNAYA por su paciencia, enseñanza, consejos, apoyo y asesorías para que la tesis se terminara como fase final de la carrera. Gracias .

Le doy gracias al **ING. JUAN R. GARIBAY BERMUDEZ** por su asesoría en la parte estadística y contribuir de esta manera a la interpretación de los resultados del presente trabajo de tesis.

A: PATRICIA ARZATE BARBOSA por haber contribuido de forma incondicional para la realización de la parte experimental del trabajo.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA por su ayuda para la realización del trabajo durante el tiempo que estuve en ese lugar. Pero sobre todo a **ROSALÍA GUEVARA LEONEL, JACQUELINE BLANCAS** por su amistad que me brindaron y aún más a : **ANA MARIA CHABLET MORGADO** y **GUADALUPE DE LA LUZ ROSAS** por su amistad, confianza y asesoría de manera incondicional en todo lo que requeri durante mi estancia en el Instituto. A todos ellos gracias.

A La profesora **PATY CAMPOS** y ala Sra. **LUCHA** por su amistad, ayuda y palabras de aliento para seguir adelante. Gracias.

A **MARTHA ,ADRIANA, MAGOS, GABY, MIREYA, LUPITA, ALMA, Y A LA 18ava DE Q.F.B.** Por los grandes momentos que disfrutamos en la FES-C , tanto de apoyo como de amistad. Doy gracias a todos ellos.

INDICE

Lista de abreviaturas

Lista de cuadros

Lista de figuras

Lista de tablas

	PAGINA
1.0	Introducción..... 1
2.0	Generalidades..... 3
2.1	Diagnóstico..... 10
2.2	Sistemas de Hemocultivos..... 11
2.2.1	Hemocultivos manuales..... 11
2.2.1.1	Ruiz Castañeda..... 11
2.2.1.2	Septi - Check..... 11
2.2.1.3	Oxoid..... 12
2.2.1.4	Isolator..... 12
2.2.2	Sistemas de hemocultivo automatizados..... 12
2.2.2.1	BACTEC radiométrico..... 12
2.2.2.2	BACTEC-No radiométrico..... 13
2.2.2.3	BioArgos..... 13
2.2.3	Sistemas de monitoreo continuo..... 13
2.2.3.1	BACTEC 9120/9240 13
2.2.3.2	ESP..... 13
2.2.3.3	Vital..... 14
2.2.3.4	Micro Scan..... 14
2.2.3.5	BACT/ALERT 14

PAGINA

2.2.3.5.1	Funcionamiento del sistema BACT/ALERT.....	16
2.2.3.5.2	Operación del sistema BACT/ALERT	18
3.0	Epidemiología.....	22
4.0	Antibióticos.....	24
5.0	Objetivos.....	27
5.1	Objetivo general.....	27
5.2	Objetivos particulares.....	27
6.0	Material.....	28
7.0	Método.....	31
8.0	Diagrama de trabajo 1.....	32
8.1	Diagrama de trabajo 2.....	34
9.0	Resultados.....	36
10.0	Discusión.....	62
11.0	Conclusiones.....	68
	Apéndice A.....	70
12.0	Bibliografía.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

E.coli	<i>Escherichia coli</i>
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
P.aeruginosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B.abortus	<i>Brucella abortus</i>
C.albicans	<i>Candida albicans</i>
C.perfringens	<i>Clostridium perfringens</i>
m.o	microorganismo
Ach	Agar chocolate
AMC	Agar MacConkey
BHI	Caldo Infusión cerebro corazón
SCD	Digerido soya caseína
Botellas FAN	Botellas Factor neutralizante de antibiótico
Botellas PEDI-BACT	Botellas pediátricas
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
U.R	Unidades de reflectancia
()	minutos
rpm	revoluciones por minuto
N ₂	Nitrógeno molecular
CO ₂	Dióxido de carbono
SO ₄ ²⁻	Sulfatos
INP	Instituto Nacional de Pediatría

SRIS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
CID	Coagulación intravascular diseminada
SDRA	Síndrome de disfunción renal aguda
SCN	Sistema nervioso central

LISTA DE CUADROS

	PAGINA
CUADRO 1 Sepsis y concepto de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).....	4
CUADRO 2 Terminología propuesta de un proceso séptico (SRIS) en niños.....	5
CUADRO 3 Microorganismos causantes de sepsis en los diferentes grupos de edad del paciente pediátrico.....	6
CUADRO 4 Síndromes clínicos causados por bacteremias y fungemias en pediatría.....	8
CUADRO 5 Componentes de métodos manuales.....	71
CUADRO 6 Componentes de sistemas automatizados.....	72
CUADRO 7 Componentes de sistemas de monitoreo continuo.....	73

LISTA DE FIGURAS

		PAGINA
FIGURA 1	Sistema BACT/ALERT para hemocultivos.....	14
FIGURA 2	Sensor de CO ₂ del sistema BACT/ALERT.....	17
FIGURA 3	Forma de monitorear las celdas del sistema.....	18
FIGURA 4	Descripción de la botella del sistema BACT/ALERT.....	19
FIGURA 5	Botella de sistema Ruiz Castañeda.....	20
FIGURA 6	Botella de sistema Septi-Check.....	20
FIGURA 7	Botella de sistema Opticult.....	20
FIGURA 8	Botella de sistema Oxoid.....	20
FIGURA 9	Tubo de sistema Isolator.....	21
FIGURA 10	Botellas de sistema BACTEC.....	21
FIGURA 11	Botellas de sistema BACT/ALERT.....	21
FIGURA 12	Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
FIGURA 13	Crecimiento <i>Escherichia coli</i>	37
FIGURA 14 Y 15	Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
FIGURA 16	crecimiento <i>Brucella abortus</i> (7 días).....	38
FIGURA 17	crecimiento <i>Brucella abortus</i> (30 días).....	38
FIGURA 18	crecimiento <i>Candida albicans</i>	38
FIGURA 19	crecimiento <i>Clostridium perfringens</i>	38
FIGURA 20	Tiempo de detección VS Volumen <i>E. coli</i>	40
FIGURA 21	Tiempo de detección VS Volumen <i>S. aureus</i>	40
FIGURA 22	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>E. coli</i>	42
FIGURA 23	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>S. aureus</i>	42
FIGURA 24	Tiempo de detección VS Volumen <i>P. aeruginosa</i>	45
FIGURA 25	Tiempo de detección VS Volumen <i>B. abortus</i>	45
FIGURA 26	Tiempo de detección VS Volumen <i>C. albicans</i>	46
FIGURA 27	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>P. aeruginosa</i>	48

	PAGINA
FIGURA 28	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>B.abortus</i> 48
FIGURA 29	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>C.albicans</i> 49
FIGURA 30	Tiempo de detección VS Volumen <i>C. perfringens</i> 51
FIGURA 31	Tiempo de detección VS Atmósfera <i>C.perfringens</i> 51
FIGURA 32	Tiempo de detección VS Botellas <i>E. coli</i> 53
FIGURA 33	Tiempo de detección VS Botellas <i>S.aureus</i> 53
FIGURA 34	Tiempo de detección VS Botellas <i>P. aeruginosa</i> 55
FIGURA 35	Tiempo detección VS Botellas <i>B. abortus</i> 55
FIGURA 36	Tiempo de detección VS Botellas <i>C. albicans</i> 56
FIGURA 37	Tiempo de detección VS Botellas <i>C. perfringens</i> 58

LISTA DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1	UFC/ml que detecta el sistema BACT/ALERT en base a volumen..... 60
TABLA 2	Subcultivos terminales realizados a hemocultivos retirados del sistema BACT/ALERT después de 7 días 61

JUSTIFICACION

Las botellas FAN del sistema BACT/ALERT han sido designadas para minimizar el efecto tóxico de los elementos de la sangre que impedirían la recuperación de los microorganismos en los hemocultivos , siendo de particular importancia en aquellos casos de pacientes que se encuentran bajo tratamiento , así como de aquellos componentes naturales que existen en la sangre.

HIPOTESIS

La botella FAN entre sus componentes , incluye algunos que tiene una acción neutralizante sobre varios antibióticos (Ecosorb , Polianetol sulfonato de sodio , Carbón activado) y sobre los agentes específicos e inespecíficos que se encuentran en la sangre , puesto que los pacientes ya cuentan con una terapia establecida. Si en realidad se lleva a cabo dicha acción neutralizante entonces se podrá realizar una mejor recuperación de microorganismos en un menor tiempo al descrito con el empleo de otros sistemas.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de salubridad y Asistencia, en el periodo comprendido entre 1997 y 1999.

En la práctica bacteriológica, el diagnóstico de bacteremia o fungemia se realiza por medio del hemocultivo. Para ello, existen diferentes métodos de detección, los cuales se han ido refinando, con el fin de acortar el tiempo de obtención del resultado. Entre los sistemas con que se cuenta en la actualidad, se tiene al BACT/ALERT (Organon Technica), basado en el análisis colorimétrico, que permite detectar la producción de bióxido de carbono, generado del metabolismo bacteriano. Su monitoreo se realiza cada 10 minutos, por lo que la detección es rápida en caso de positividad. Sin embargo, la sensibilidad puede ser afectada por la terapia al paciente, recolección de la muestra, volumen de esta sobre todo en neonatos, etc. Por lo anterior, el sistema BACT/ALERT, ha sido actualizando las botellas de hemocultivo para su mayor eficiencia. Inicialmente se basó en la utilización de medio soya tripticasa para la recuperación de microorganismos aerobios y anaerobios (botella estándar). Posteriormente designó un medio hecho a base de caldo infusión cerebro corazón, para uso pediátrico (Botella PEDI-BACT) y recientemente desarrolló la botella FAN., con medio enriquecido y componentes adicionales (Ecosorb, carbón activado, tierra de Fuller's), cuya acción neutralizante tiene por finalidad, la recuperación de todo tipo de microorganismos causantes de septicemia, incluyendo los fastidiosos, aún cuando el paciente este recibiendo antimicrobianos.

El objetivo estuvo dirigido a determinar el comportamiento in vitro de las diferentes especies bacterianas en las botellas FAN y PEDI-BACT.

Para ello se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29313, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 14053, *Brucella abortus* y *Clostridium perfringens* cepas INP. De estas se realizaron diluciones en caldo de Müller-Hinton de 1:100 a 1:100 000, a partir de una densidad de McFarland de 0.5%. Se preparo un inóculo bacteriano con un volumen conocido de sangre, otros dos a los que se adicionó además amikacina y cefotaxime respectivamente, los que fueron inoculados en botellas PEDI-BACT y FAN aerobio y anaerobio según el caso, La incubación fue a 37°C durante 7 días como máximo. Al finalizar este período, se realizó la corroboración de desarrollo e identificación de la especie trabajada por los procedimientos habituales.

Se observó que la cantidad mínima de bacterias para evidenciar desarrollo en el 100% de los cultivos practicados, fue de 62 UFC por mililitro, aún considerando los microorganismos fastidiosos. No siendo el caso de *E.coli*, donde fue suficiente un inóculo de 3-6 UFC/ml tomando como punto de corte 0.5 ml de sangre inoculada al medio de cultivo. Sin embargo no se recomiendan volúmenes menores ya que la sensibilidad disminuye, redundando en cultivos falsos negativos. Se observo una curva de crecimiento característica de la especie en estudio, lo cual es explicable en base al metabolismo del microorganismo. En tanto que dependiendo de la densidad y viabilidad de este, será la cantidad de bióxido de carbono producido y por lo tanto, la velocidad de detección de un cultivo positivo. La presencia de Ecosorb no interfirió con las botellas FAN para recobrar y detectar microorganismos, además el tiempo de detección en FAN y PEDI-BACT, fueron similares excepto en anaerobios. Se demostró la neutralización de antimicrobianos al emplear las botellas FAN. Estudios preliminares indican que el Ecosorb es capaz de remover otros factores potencialmente inhibidores; complemento, lisosima, transferrina, etc.

1.0 INTRODUCCION

La bacteria es un organismo celular simple, diferente a las células del humano, no tiene organelos de membrana intracelular como núcleo, aparato de golgi, retículo endoplasmico o mitocondrias.

Tiene un metabolismo esencial y una actividad biosintetica, que puede llevarse a cabo tanto en citoplasma como en la envoltura celular. Las bacterias son organismos procariotes cuya diferencia con las eucariotes es la presencia de un núcleo verdadero en estas ultimas, sin embargo, hay muchas más diferencias, incluyendo las estructurales, estas son importantes porque proveen un blanco para la acción de los antibióticos , ya que estos son selectivamente tóxicos . Un buen antibiótico mata a la célula blanco sin dañar la célula huésped.

Para poder conocer a las bacterias, estas se clasifican taxonómicamente de acuerdo a sus características descriptivas como son : Estructura y morfología, estudios de ADN y actividad metabólica .

También se pueden identificar a las bacterias por medio de su tamaño y forma. El tamaño varia en un rango de 0.15 μm a 250 μm , dependiendo del tipo de bacteria que se trate . En cuanto a su forma, las bacterias de importancia clínica se pueden encontrar con forma esférica (cocos), elíptica (bacilos), espirales (espiroquetas) y pequeños bacilos cortos gordos (cocobacilos).

Así mismo la agrupación que presentan , es característica de la bacteria, es decir, pueden encontrarse en cadenas (*Streptococcus*), racimos (*Staphylococcus*), tetradas de cocos llamadas sarcinas y cocos en pares denominadas diplococos.

La tinción de Gram ayuda a diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos que son: Gram positivos y Gram negativos de acuerdo a sus componentes estructurales¹.

En algunos casos la bacteria se subdivide en serotipos o subespecies en base a sus antígenos de superficie, habilidad para infectar por medio de bacteriófagos, estado de enfermedad o características metabólicas y biosintéticas.

Las bacteremias constituyen un problema serio en el paciente pediátrico, que puede conducir al desarrollo de sepsis y evolucionar a la muerte . De ahí la urgencia de realizar una rápida detección e identificación del microorganismo causal , con el fin de establecer un diagnóstico etiológico definitivo.³⁸

Existen diferentes factores que afectan la detección del agente causal, entre estos se encuentran; el volumen de la muestra, presencia de agentes antimicrobianos, composición basal del medio de cultivo, etc.

En la actualidad es desconocido el número óptimo de hemocultivos, el volumen de la muestra necesario para detectar bacteremia en niños, que sea suficientemente sensible para evidenciar una bacteremia verdadera.

En la solución de estos problemas, se ha propiciado la creación de diferentes sistemas, como el sistema BACT/ALERT (Organon teknica), con monitoreo continuo, el cual realiza la detección de CO₂, producto del metabolismo bacteriano a través de un sistema colorimétrico, basado en el pH. Para su empleo se cuenta con una gama de botellas entre las que se tienen la PEDI-BACT y la FAN, esta última adicionada con componentes, cuya principal acción, es la neutralización de los agentes antimicrobianos, así como un medio rico en nutrientes que permitirá el desarrollo del microorganismo para su futura identificación.³⁸

2.0 GENERALIDADES

La fiebre es uno de los problemas comunes en pacientes pediátricos, sin embargo las bacteremias representan el 15% en los niños con fiebre y constituye una importante secuela de infección.^{23,35}

La bacteremia se define como la presencia de bacterias en sangre.^{23,40} Esta se clasifica en :

- ♦ **Bacteremia transitoria.**- ocurre después de la manipulación de tejido infectado (ejemplo Abscesos), durante ciertos procedimientos quirúrgicos, cuando hay manipulación de superficies mucosas contaminadas (manipulación dental y endoscopia gastrointestinal).
- ♦ **Bacteremia intermitente.**- cuando un microorganismo recurre en un mismo paciente, se caracteriza por estar asociado a infecciones cerradas como abscesos intra-abdominales y en pacientes con infecciones localizadas y sistémicas.
- ♦ **Bacteremia continua.**- característica de endocarditis infectiva y otras infecciones intravasculares (tromboflebitis supurativa, brucelosis, fiebre tifoidea)

Las bacteremias se dividen en dos grupos: unimicrobianas y polimicrobianas.^{4,14,23,40}

Sin embargo, de las infecciones bacterianas las septicemias son de gran importancia, ya que constituyen un porcentaje significativo de mortalidad en los hospitales.^{4,23,35}

Para poder definir lo que es la sepsis se tiene que hablar de Síndrome De Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) en el cual las manifestaciones clínicas consisten en : taquicardia, hiperventilación, distemias y alteraciones en la fórmula

blanca, todas son evidencia de que el organismo entero, pero en especial en el sistema cardíopulmonar, tiene que aumentar su trabajo para satisfacer las demandas metabólicas incrementadas de los tejidos, mismos que aumentaron su metabolismo a consecuencia de un proceso inflamatorio generalizado.

Está respuesta es inespecífica y puede presentarse por destrucción tisular extensa como en quemaduras graves, traumatismo, hipoxia o pancreatitis. Si los datos de SRIS ocurre en quien se sospeche o demuestre clínicamente uno o más focos infecciosos, la respuesta orgánica debe ser denominada como sepsis, independientemente o no de que existan hemocultivos positivos, y sin importar que el microorganismo involucrado sea bacteria, virus, hongo o parásito. Una vez iniciado el proceso infeccioso SRIS-sepsis, el organismo afectado se encuentra en alto riesgo de continuar la evolución a veces fatal hacia sepsis grave (choque temprano), choque séptico evidente y disfunción multiorgánica, en los cuales todos son expresiones clínicas de gravedad creciente de un mismo proceso fisiopatológico.³¹

Existen diferentes definiciones de sepsis entre las que destacan:

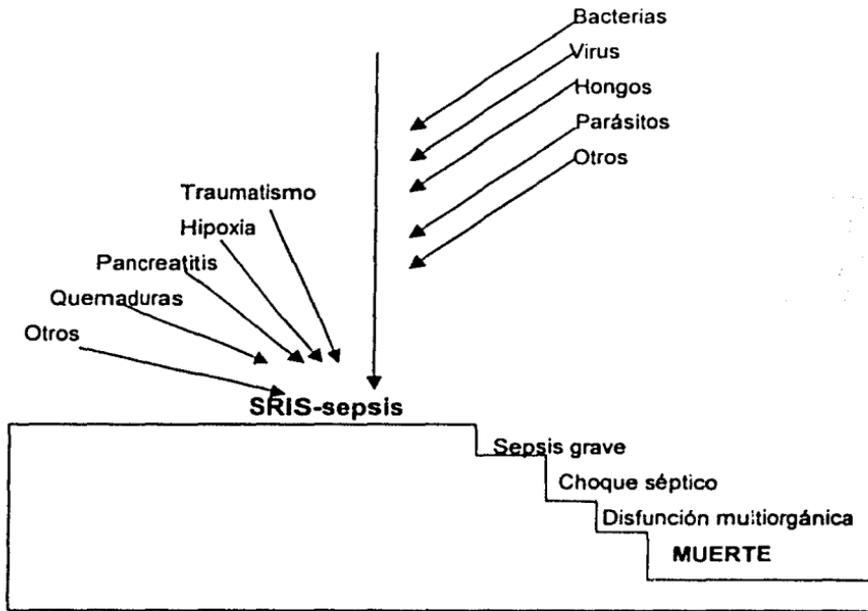
La sepsis se define como una enfermedad sistémica asociada con la presencia de m.o. o de sus toxina (constituyentes celulares y/o subproductos metabólicos) en la sangre.^{3,26,40} Es decir, es una respuesta inflamatoria sistémica a una infección demostrada por tanto se trata de un SRIS con cultivos positivos o infección clínicamente evidente.^{3,31,36}

Sepsis grave.- sepsis asociada con disfunción orgánica o hipotensión arterial, la cual responde a una o dos cargas rápidas de líquidos.

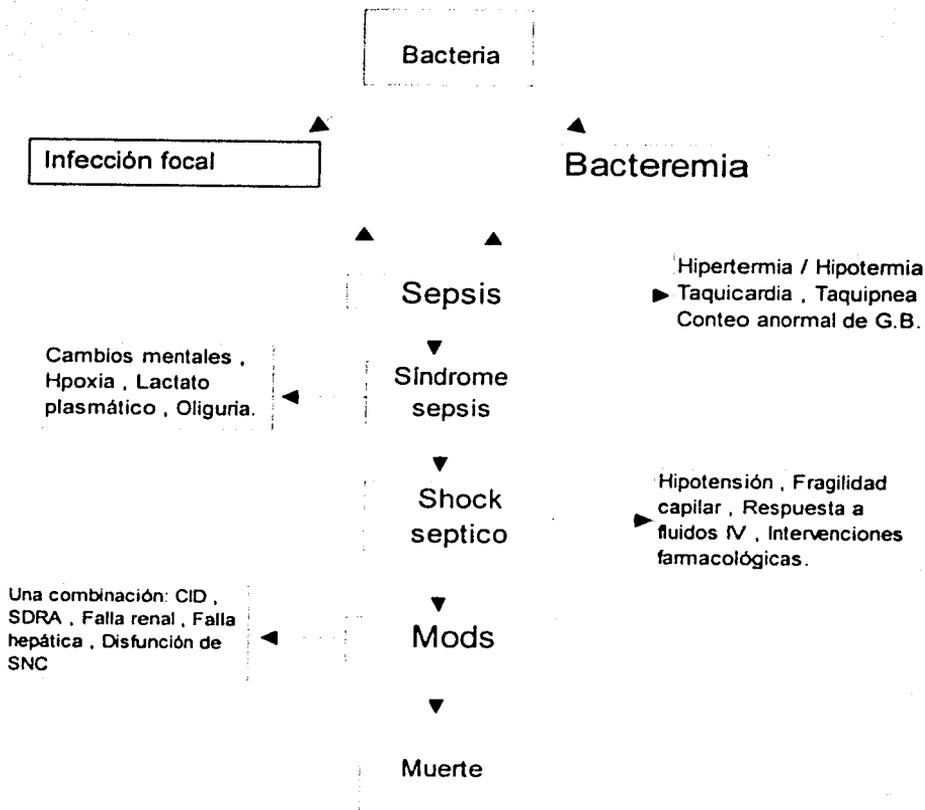
Choque séptico .- similar a sepsis grave, pero la hipotensión arterial no reacciona a las cargas de líquidos.

Síndrome de disfunción orgánica múltiple .- Cualquier combinación de coagulación intravascular diseminada, SRIS, insuficiencia renal, insuficiencia hepatobiliar y alteraciones del sistema nervioso central.^{3,25,31}

La presencia de m.o. en la sangre se debe a la falla de las defensas del organismo ante una infección localizada.^{23,27}



CUADRO No. 1 : Sepsis y el concepto de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS).³¹



CUADRO No.2: Terminología propuesta de un proceso séptico. Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica en niños .²⁷

CUADRO No 3: Microorganismos causantes de sepsis en los diferentes grupos de edad en el paciente pediátrico.

ORGANISMO	RN	INFANTES	NIÑOS
Gram positivos aerobios			
<i>Staphylococcus aureus</i>	2+	2+	3+
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	3+	3+	3+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	raro	4+	3+
<i>Streptococcus Gpo. A</i>	raro	+	2+
<i>Streptococcus Gpo. B</i>	4+	+	raro
<i>Enterococcus y No Enterococcus</i>	2+	+	+
<i>Listeria monocitogenes</i>	+	raro	raro
Gram negativos aerobios			
<i>Escherichia coli</i>	3+	2+	2+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	2+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
<i>Salmonella</i>	+	+	raro

<i>Otros bacilos Gram negativos entericos</i>	+	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	raro	2+	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	raro	2+	2+
Anaerobios			
<i>Bacteroides fragilis</i>	raro	+	+
<i>Otros Bacteroides</i>	raro	raro	raro
<i>Clostridium spp</i>	raro	raro	raro
<i>Fusobacterium</i>	raro	raro	raro
Hongos			
<i>Candida albicans</i>	2+	+	+
<i>Candida spp</i>	+	raro	raro
<i>Malassezia spp</i>	+	raro	raro

CUADRO No. 3 .- Donde : raramente(raro),+ ocasionalmente,2+ moderadamente,3+ frecuentemente, 4+ muy frecuente. en base a su aislamiento.

CUADRO No 4: Síndromes clínicos causados por bacteremias y fungemias en pediatría.

ORGANISMO	SINDROME
Gram positivos aerobios	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Osteomielitis, sepsis, endocarditis, catéter asociado a bacteremia.
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	Bacteremia asociada a catéter
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía, meningitis, bacteremia oculta.
<i>Streptococcus Gpo. A</i>	Sepsis, neumonía, osteomielitis.
<i>Streptococcus Gpo. B</i>	Sepsis neonatal, neumonía y meningitis
<i>Enterococcus y No Enterococcus</i>	Sepsis neonatal, urosepsis, peritonitis.
<i>Listeria monocitógenes</i>	Sepsis neonatal, meningitis.
Gram negativos aerobios	
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis neonatal, meningitis, urosepsis, peritonitis.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sepsis neonatal, peritonitis.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Sepsis asociada a catéter, peritonitis.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Sepsis en pacientes neutropénicos.

Continua...

Continuación de : SÍNDROMES CLINICOS.

<i>Salmonella</i>	Salmonelosis en infancia, enf. Celular Sickle.
Otros Gram negativos entericos	Peritonitis, urosépsis.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Meningitis, artritis, celulitis, neumonia.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Púrpura fulminante, meningitis, bacteremia oculta..
Anaerobios	
<i>Bacteroides fragili</i>	Peritonitis, fascitis.
Otros <i>Bacteroides</i>	Peritonitis, fascitis.
<i>Clostridium spp</i>	Peritonitis, fascitis.
<i>Fusobacterium</i>	Peritonitis, tromboflebitis séptico.
Hongos	
<i>Candida albicans</i>	Fungemia asociada a catéter., neumonia
<i>Candida spp.</i>	Fungemia asociada a catéter, neumonia.
<i>Malassezia spp</i>	Sepsis neonatal.

2.1 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

El diagnóstico de sepsis, sepsis grave, shock séptico y bacteremia es de tipo clínico, ya que la confirmación de estos, es realizada a través de los hemocultivos, los cuales se practican cuando hay sospecha de dichos procesos infecciosos¹. Debido a la importancia de los hemocultivos, estos se deben efectuar con procedimientos adecuados, y evitando la contaminación.⁴⁰

Sin embargo para lograr el aislamiento de los microorganismos en cuestión se le deben de proporcionar todos los nutrientes necesarios para que el microorganismo realiza su biosíntesis y produzca la energía necesaria para su desarrollo, como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Además de oligoelementos los cuales le ayudan en la catálisis de reacciones estos son: magnesio, zinc, cobalto, molibdeno, níquel y cobre. Por lo que un medio de cultivo adecuado debe de contener dichos nutrientes en cantidades adecuadas, y para ello existen diferentes tipos de medios de cultivo que ayudaran en la identificación del microorganismo: medios definidos o sintéticos porque sus componentes son conocidos y complejos por que algunos de los ingredientes son de concentración desconocida .

Hay otro tipo de medios: Unos permiten el crecimiento de unos microorganismos e inhiben a otros ,estos son denominados selectivos (ejemplo. Sales biliares, colorantes fucsina básica y cristal violeta). Los medios diferenciales ayudan a diferenciar entre grupos o bien a realizar una identificación tentativa según sus características biológicas. Un tercer grupo mantiene el crecimiento de muchos microorganismos , son de uso general , pero al incorporar sangre y otros nutrientes especiales se denominan enriquecidos, el hemocultivo pertenece a este grupo

El hemocultivo .- Se realiza con la sangre obtenida del paciente por venipuntura e inoculada en una o más botellas o tubos de cultivo. Estrictamente hablando, se refiere a la sangre obtenida del paciente que es cultivada para hacer evidente la presencia de un m.o.⁴¹

En muchas situaciones los hemocultivos son la única fuente inmediata posible de hallazgos del agente etiológico, para la determinación de sensibilidad o antimicrobianos.⁴⁰

2.2 SISTEMAS DE HEMOCULTIVO

Los sistemas de hemocultivo se pueden dividir en dos grupos:

2.2.1 Hemocultivos manuales.

Los hemocultivos manuales consisten en utilizar botellas con medio de cultivo y una atmósfera parcial de CO₂. Para poder convertir las botellas a aerobias, se incrementa la concentración de oxígeno mediante la ventilación de las mismas, después de haber sido inoculadas.

Posterior a la inoculación, las botellas son inoculadas con o sin agitación y se revisan periódicamente para observar el crecimiento mediante evidencias macroscópicas, dichas evidencias consisten en la presencia de: hemólisis, turbidez, producción de gas, chocolatización de la sangre, y la presencia de colonias en el agar o en el menisco del fluido.⁴¹

Dentro de este grupo se encuentran los hemocultivos bifásicos :

2.2.1.1 Ruiz - Castañeda .- consiste en una fase sólida estéril (que se localiza en posición vertical, esta al vaciarse es en forma líquida), después se

agrega una fase líquida estéril que se encontrara en el fondo del frasco. La detección de crecimiento es a través de la visualización de colonias en el medio sólido o bien cambios en el medio líquido. Sirve para la detección de m.o. fastidiosos aerobios así como *Bruceella*.²⁶ (Ver fig. 5).

Existen sistemas comerciales que emplean el mismo fundamento de Ruiz-Castañeda utilizando medios de cultivo enriquecido como:

2.2.1.2 Septi - Check (Becton Dickinson Microbiology Systems).

Las botellas empleadas para este sistema tienen una placa que sostiene agar, estas después de haber sido inoculadas la placa que contiene el agar queda sumergida al ser invertida la botella temporalmente, esta posición le permite el depósito de m.o. ahí presentes y por consiguiente la formación de colonias, posteriormente son revisadas para observar la evidencia de crecimiento en el agar contenido en la placa. (Ver fig. 6).

Al igual que Septi-Check , **Opticult** (Becton Dickinson Microbiology Systems), presenta el mismo fundamento.^{23,41} (Ver fig. 7).

2.2.1.3 Oxoid Signal (Oxoid USA Columbia. MO).

Consiste en una botella aerobia, después de que se inocula se observa para ver si hay desarrollo microbiano, en este hay producción de metabolitos como el CO₂ (gases) por lo que la presión interna se incrementa. Este sistema usa el principio del manómetro, tiene una salida que es una aguja que termina en un colector en el cual se deposita la sangre y medio de cultivo, estas serán desplazadas por la presión que se ejerce dentro del vial debido al desarrollo microbiano.^{23,41} (Ver fig8).

2.2.1.4 Isolator (Wampole Laboratories, Crambury , NJ) .

Es un sistema manual que se basa en la lisis centrifugación. Este sistema utiliza tubos que contiene reactivos que provocan la lisis, después de esta se requiere una centrifugación (3000 rpm/30°) de la muestra, el sobrenadante se descarta y la pastilla se remueve en el tubo y se inocular en medios sólidos de acuerdo al tipo de cultivo.^{23,41}

La utilización de métodos manuales de hemocultivo depende de las necesidades y recursos con los que cuenta el laboratorio así como del material y equipo elegido.^{23,41} (Ver fig. 9).

2.2.2 Sistemas de hemocultivo automatizados

Los sistemas automatizados no han eliminado en su totalidad a los métodos manuales, puesto que se adapta el sistema a las necesidades del laboratorio, ya que si este procesa un número pequeño de muestras se debe considerar el costo.

Los sistemas automatizados cuentan con una incubadora y generalmente un sistema de agitación , todo esto es para hacer más eficiente el procesamiento de los hemocultivos.²³

Dentro de este grupo encontramos:

2.2.2.1 BACTEC radiométrico (Becton Dickinson Microbiology Systems). 225,301, y 460.

Este sistema detecta el crecimiento microbiano mediante la concentración de CO₂ presente en la botella. Conforme el crecimiento bacteriano avanza, de su metabolismo se libera CO₂ al medio. Este es liberado en la atmósfera del frasco.

La atmósfera es posteriormente muestreada y se detecta el cambio de CO₂ en el medio. La cantidad está relacionada con el Índice de crecimiento, un exceso en este Índice, es considerado evidencia de crecimiento bacteriano.^{6,23,41}

2.2.2.2 BACTEC No radiométrico. (BDMS) . 660,730,860.

El sistema operacional es similar al radiométrico, excepto que utiliza espectrofotometría de infrarrojo para la detección de CO₂ en la atmósfera de la botella. La utilización del infrarrojo es para la eliminación de sustancias radiactivas . El monitoreo es por tiempo.^{5,6,23,41,42}

2.2.2.3 Bio Argos (Sanofi Diagnostics Pasteur,Marnes la Coquett,France).

Es similar a BACTEC No radiométrico . No es de monitoreo continuo y utiliza espectrofotometría de infrarrojo para la detección de CO₂ producido. Cuenta con un equipo computarizado muy sofisticado.^{6,23,41}

2.2.3 Hemocultivos de monitoreo continuo.

Difiere de los otros sistemas de hemocultivo en que monitorea el crecimiento bacteriano cada 10 minutos, los datos obtenidos los transmite a la computadora donde son analizados. Dichos datos se coleccionan por día y por botella. Un número de datos suficientes avalan la determinación para decidir si un cultivo es positivo.

Los algoritmos utilizados por la computadora minimizan el número de falsos positivos.

Estos sistémicos incorporan un sistema incubador y mecanismo de agitación, las botellas examinadas y dadas como positivas requieren ser manipuladas después de haber eliminado la contaminación cruzada.²³

Dentro de este tipo de sistemas sobresalen:

2.2.3.1 BACTEC 9120/9240. (BDMS).

Utiliza a la fluorescencia como método de detección. Conforme aumenta el CO₂ proveniente del crecimiento bacteriano, el sensor fluorescente incide en el botón y entonces la botella incrementa la fluorescencia.

El sistema se monitorea cada 10'.^{23,41} (Ver fig. 10).

2.2.3.2 ESP (Difco Laboratorios).

Detecta el crecimiento bacteriano por monitoreo de botellas basándose en un principio de monitoreo manométrico por consumo y/o producción de gas. Lo que se monitorea es la concentración de CO₂ que ocasiona directamente los cambios en el sensor.^{23,41}

2.2.3.3 Vital (bioMerieux Vitek , Hazelwood,Mo).

El crecimiento bacteriano es detectado por medio de un compuesto líquido fluorescente, presente en el medio, este compuesto lo que detecta son iones hidrónico, electrones y radicales producidos por el metabolismo bacteriano. Lee la disminución de la fluorescencia por medio de algoritmo computarizado.^{23,41,42}

2.2.3.4 MicroScan .

Detecta el crecimiento por medio de fluorescencia . utiliza sensores fluorescentes en el fondo de la botella⁴¹

2.2.3.5 BACT/ALERT (Organon Teknica Corp Durham, N.C).

Se basa en la detección de CO_2 por colorimetría, el CO_2 proviene del metabolismo bacteriano e interactúa con el agua incorporada, liberándose así iones hidrónico, los cuales disminuyen el pH en el sensor causando así el cambio de color del mismo, este en un inicio es negro luego pasara a verde y por último toma una coloración amarillo, de acuerdo al incremento de la concentración de CO_2 .^{23,41} (Ver fig 11).

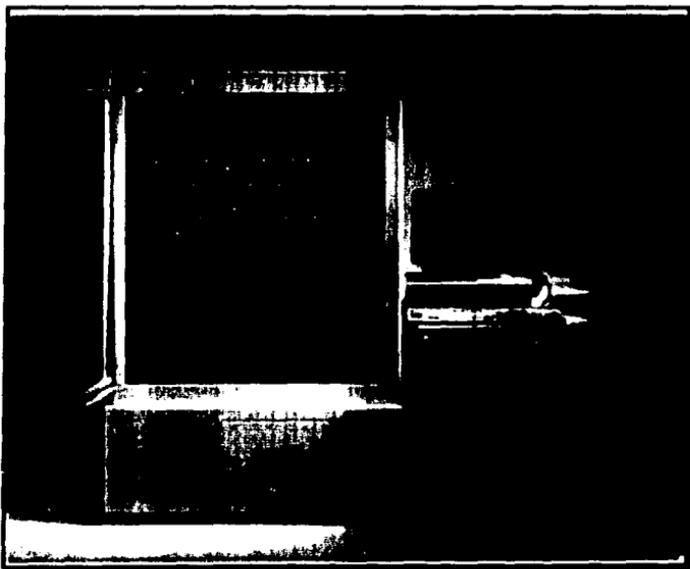


FIG. 1.- SISTEMA BACT/ALERT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En resumen los sistemas automatizados son:

SISTEMA	MANUFACTURA	MET. DE DETECCION DE CRECIMIENTO	MONITOREO CONTINUO
BACTEC 460	BDMS	Radiométrico	NO
BACTEC 660	BDMS	Espectrofotometría Infrarrojo	NO
BACTEC 730	BDMS	Espectrofotometría Infrarrojo	NO
BACTEC 860	BDMS	Espectrofotometría Infrarrojo	NO
BACTEC 9240	BDMS	Fluorescente	SI
BACTEC 9120	BDMS	Fluorescente	SI
ESP	DIFCO LAB.	Presión de gas	SI
BIO ARGOS	SDP	Espectrofotometría Infrarrojo	NO
VITAL	bio MERIEUX	Fluorescencia	SI
BACTE/ALERT	OTC	Colorimetría	SI

2.2.3.5.1 FUNCIONAMIENTO DEL Bact/Alert

El BACT/ALERT es un Sistema Vigilante de Detección Microbiana, utiliza un sensor colorimétrico y refleja la luz para determinar la cantidad de dióxido de carbono (CO_2) que se disuelve en la medio de cultivo.

El sistema BACT/ALERT utiliza una botella especial para sus tipos de celdas . Existen varios tipos de botellas, las cuales se designan con nombres de acuerdo al medio, volumen del mismo y atmósfera que contiene la botella, como son las botellas estándares (aerobia y anaerobia), PEDI-BACT (aerobia y anaerobia) y finalmente las FAN (aerobia y anaerobia).

La propiedad del medio de cultivo, esta constituido por caldo soya tripticasa o caldo infusión cerebro corazón, según sea el caso, además, de un complejo de aminoácidos y carbohidratos, ambos designados como soporte de crecimiento para la producción de CO_2 óptima . Así como polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante.

En el fondo de las botellas existe un sensor en forma de botón, el cual esta separado del medio de cultivo por una membrana semipermeable . El sensor se impregna con vapor de agua al ser autoclaveadas durante el proceso de manufactura.

La membrana tiene la propiedad de ser impermeable para más iones, incluyendo iones hidrógeno de algunos componentes del medio, así como los productos provenientes de la degradación de la sangre . Aunque hay que señalar que también es impermeable al agua .

Sin embargo, es permeable al CO_2 .El dióxido de carbono producido por el crecimiento de los microorganismos difunde a través de la membrana hacia el

sensor, ahí se disuelve en el agua, generando iones hidrógeno, de acuerdo a la siguiente ecuación :



Los iones hidrógeno pueden interactuar con el sensor, el cual es azul o verde oscuro en medio alcalino . Conforme el CO_2 es producido y se disuelve en el agua, la concentración de iones hidrógeno incrementa y el pH disminuye .Esto hace que el sensor cambie de color eventualmente a amarillo . La luz roja se refleja por el sensor y es proporcional a la concentración de CO_2 .³⁴

Para la detección de este CO_2 , el sistema se divide en dos : una primera mitad que contiene una incubadora (donde la temperatura se puede ajustar de 35 - 37°C +/- 0.5°C), esta se compone de 11 bloques, los cuales se agitan continuamente a 60 rpm, además de contar con un detector colorimétrico.

Los detectores consisten en un diodo que emite una luz roja y un fotodiodo, el cual absorbe esa misma luz.

La luz emitida por el diodo interactúa con el sensor, para después ser reflejada por el mismo y ser absorbida por el fotodiodo, el cual produce un cierto voltaje, que es proporcional a la intensidad de la luz reflejada y a su vez a la concentración de CO_2 dentro de la botella.

Después de haber absorbido la luz, la señal se amplifica, el voltaje queda registrado y transmitido hacia la microcomputadora para su análisis.

El instrumento realiza este proceso cada 10 minutos (144 veces al día). Los puntos de los datos son registrados como unidades de reflectancia contra tiempo y el resultado es una curva de crecimiento.

El algoritmo para la detección de crecimiento está basada en el análisis de la velocidad de cambio de la concentración de CO₂ en la botella.

La concentración de CO₂ de la botella es comparada contra su misma velocidad de cambio, más que contra un valor fijo.³⁴

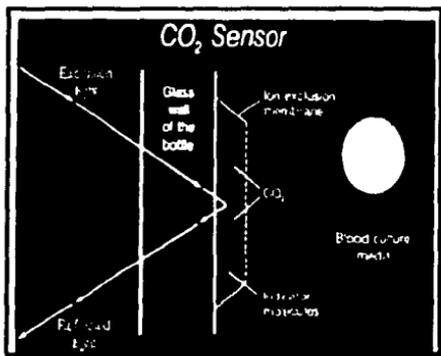


FIG. 2.-SENSOR DE CO₂ DEL SISTEMA BACTIALERT.

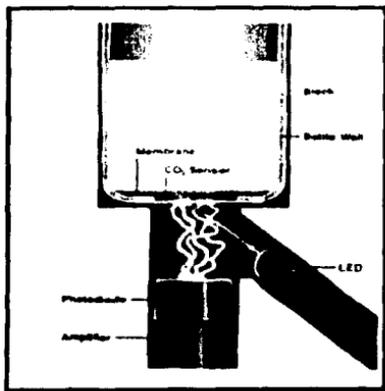


FIG 3.- FORMA DE MONITOREAR LAS CELDAS DEL SISTEMA

2.2.3.5.2 OPERACIÓN DEL SISTEMA BACT/ALERT

Una vez inoculadas las botellas, se cargan en el sistema, asignándoles un número y una identificación del paciente dentro de la computadora.

La computadora le designa un lugar en el sistema y por tanto, una celda . Estas celdas son identificadas por iluminación de un pequeño rayo de luz verde adyacente a la celda.

Después de ser introducidas las botellas en la incubadora, la computadora envía un rayo de luz, que pasara por las celdas para obtener lecturas iniciales de las botellas nuevas.

Cuando se detecta un incremento de la concentración de CO₂ en la botella , la luz adyacente a la celda se ilumina y la computadora imprime el número asignando, identificación del paciente, número de celda, tiempo de crecimiento (cuando la botella es positiva) y tiempo de crecimiento . Después la botella es removida del instrumento, y la luz enviada a la celda indicará que puede ser usada para nuevos cultivos.

Las botellas falsas positivas (botellas dadas como positivas pero con frotis negativo) pueden ser regresadas al sistema para una incubación adicional . Botellas que no están positivas se dejan 7 días, pasado este tiempo la computadora imprime una lista de botellas negativas e ilumina la luz adyacente a la celda que contiene la botella negativa. Estas son removidas y descargadas del sistema.³⁴

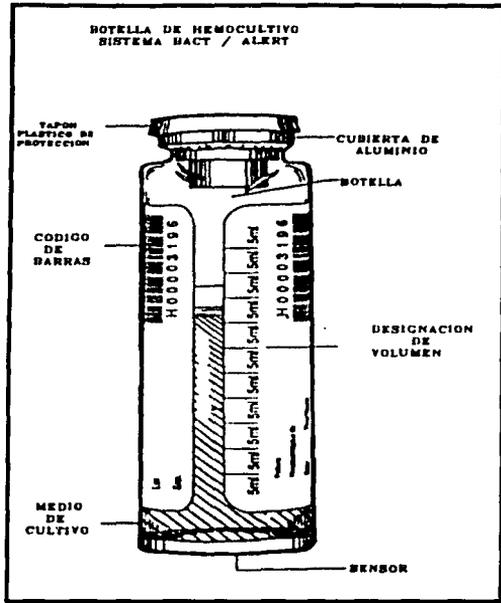


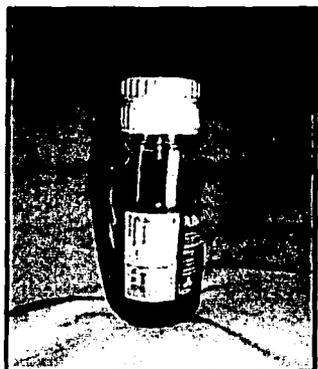
FIG. 4.- BOTELLA DEL SISTEMA BACT/ALERT



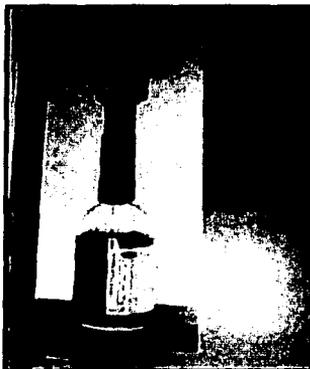
**FIG 5.- BOTELLA DE
RUIZ CASTANEDA.**



**FIG 6.- BOTELLA DE SISTEMA
SEPTI-CHEK.**



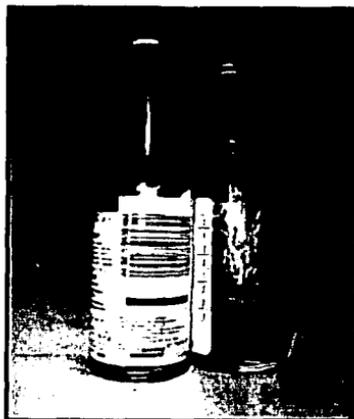
**FIG 7.- BOTELLA DE SISTEMA
OPTICULT.**



**FIG 8.- BOTELLA DE SISTEMA
OXOID.**



**FIG 9.- TUBO DE SISTEMA
ISOLATOR.**



**FIG 10.- BOTELLA DE SISTEMA
BACTEC.**



**FIG 11.- BOTELLA DE SISTEMA
BACT/ALERT.**

3.0 EPIDEMIOLOGIA

La epidemiología proporciona datos orientadores sumamente importantes acerca de un tratamiento antibiótico precoz. Para ello las septicemias deben clasificarse en dos grupos: Sepsis hospitalarias y extra - hospitalarias . Las primeras son las que se presentan en enfermos ingresados en el hospital sin que su patología fundamental justifique su desarrollo. Las segundas son aquellas en las que los enfermos, debido a su patología fundamental, ingresan ya en el hospital con el cuadro clínico séptico o una predisposición especial.^{4,20}

La frecuencia de las infecciones nosocomiales varía de unos hospitales a otros, dependiendo de las características propias de cada uno de ellos, siendo los hospitales con mayor número de camas los que presentan mayor frecuencia.²¹

En el país el índice de mortalidad relacionado con infecciones nosocomiales, fue de aproximadamente 7.5 % . Las cifras varían de acuerdo a; el método de vigilancia empleado, la localización del proceso infeccioso, el agente causal responsable y las características de los pacientes ingresados a las diferentes áreas de hospitalización.

Dentro de los métodos los más utilizados por su facilidad de realización son los estudios de prevalencia que como contabilizan las infecciones nuevas y antiguas; son los que presentan tasas mayores de infección nosocomial.²¹ También se realizan estudios de incidencia, donde se recogen datos para su informatización y posterior análisis.

El análisis de vigilancia utiliza como primera fuente de información al laboratorio de microbiología, complementando con las historias clínicas. Dentro de un mismo hospital los servicios de mayor riesgo son : las unidades de cuidado intensivo, quemados, recién nacidos y hemodialisis.

El riesgo de un paciente viene determinado por tres factores:

- a) La susceptibilidad inherente del individuo, condicionada por las características de edad, estado nutricional, naturaleza y gravedad de la enfermedad subyacente, etc.
- b) Modificación de la susceptibilidad intrínseca del paciente por los tratamientos que recibe en el hospital. Numerosos fármacos entre los que se encuentran los corticoides y citostáticos, o la radioterapia, producen un estado de inmunosupresión que facilita la infección.
- c) Exposición del paciente hospitalizado a m.o. potencialmente patógenos.²⁰

De todas las infecciones nosocomiales el 5% es debido a bacteremias, presentándose una incidencia de 0.1-1.4 % de un hospital a otro.

La mayoría de las bacteremias son secundarias a un foco infeccioso con otra localización, principalmente de tracto urinario, neumonía y herida quirúrgica.²⁰ Está es elevada ya que si se contabilizan las muertes se encuentran en la decimosegunda causa de muerte a nivel nacional.^{7,21}

Tasa de mortalidad a nivel nacional⁷:

EDAD	No. DE CASOS
< 1 año	118
1-4 años	38
5-14 años	18
15-44 años	52
45-64 años	57
65 años en adelante	118
Total	402

Tasa de mortalidad debido a sepsis:

EDAD	No. DE CASOS	
SEXO	MASCULINO	FEMENINO
< 1 año	66	51
1-4 años	18	20
5-14 años	9	9
15-44 años	28	24
45-64 años	33	24
65 años en adelante	57	60
Total	212	188

4.0 ANTIBIOTICOS

Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) , que suprimen el crecimiento de otros microorganismos e incluso de destruirlos a bajas concentraciones y sin producir efectos tóxicos en el huésped. Los antibióticos se pueden clasificar en naturales, sintéticos y semisintéticos.^{8,10}

Un fármaco antimicrobiano ideal es de toxicidad selectiva, ya que puede dañar al microorganismo en concentraciones tales que pueden ser toleradas por el huésped.

Varios métodos se usan para clasificar y agrupar a los agentes antimicrobianos, que van de acuerdo al microorganismo sobre el que actúan, efecto antimicrobiano, espectro de actividad, mecanismo de acción y estructura química.

I.- Según el microorganismo sobre el que actúan (antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, antiparasitarios)

II.- Por su efecto antimicrobiano: a)Bacteriostáticos.- cuando las concentraciones que alcanzan en suero y tejido impiden el desarrollo y multiplicación de las

bacterias sin destruirlas; y al retirarlo el microorganismo puede multiplicarse de nuevo. b) Bactericidas.- su acción es letal produciendo la lisis bacteriana con efectos irreversibles.

III.- Por su espectro de actividad (amplio espectro, espectro intermedio, espectro reducido).

IV.- Por su mecanismo de acción.-Históricamente la clasificación está basada sobre los mecanismos de acción. 1) antagonismo competitivo, 2) inhibición de la síntesis de la pared celular, 3) acción sobre membrana celular, 4) inhibición de la síntesis proteica, 5) inhibición de la síntesis de ácido nucleico.^{8,10}

V.- Por su estructura química: La cual es esencial para la actividad biológica de las moléculas. a) Penicilinas, b) cefalosporinas, c) tetraciclinas, d) macrolidos, e) aminoglucósidos, f) nitrofuranos, g) sulfonamidas, h) quinolonas⁸.

En el presente trabajo nos enfocaremos a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos ya que de esta naturaleza son los antibióticos utilizados.

Las cefalosporinas derivan de un núcleo común, el ácido cefalosporánico, sistema anular semejante al ácido penicilánico, con su anillo β -lactámico y con la diferencia que en vez del anillo pentagonal de tiazolidina, el ácido cefalosporánico posee uno hexagonal de dihidrotiazida.

Las cefalosporinas pueden ser parcialmente desactivadas por β -lactamasas y en menor grado por las penicilasas de las bacterias a través del anillo β -lactámico. Mediante la introducción de sustitutos adecuados se ha logrado desarrollar cefalosporinas de diferentes grados de sensibilidad hasta alcanzar una total resistencia frente a las β -lactamasas. Las distintas cefalosporinas se distinguen por sus cadenas laterales y por su origen, estos fármacos pueden clasificarse en: 1) naturales.- derivan de hongos del género *Cephalosporium*, ninguna se utiliza en terapéutica por no tener acción antibacteriana potente. 2) Semisintéticas.- Por

hidrólisis la cefalosporina C da origen al ácido 7-aminocefalosporánico a partir del cual se han obtenido diversas cefalosporinas semisintéticas más potentes que las naturales ⁸.

Así las cefalosporinas generalmente se han clasificado en generaciones, basándose en su actividad antimicrobiana.

Las cefalosporinas de tercera generación son menos activas contra cocos Gram positivos pero mucho más activas contra las Gram negativas.

Mecanismo de acción.-La síntesis de la pared es un proceso donde intervienen al menos treinta enzimas y tiene lugar en cuatro etapas: la primera constituye el eslabón que une dos bloques básicos, el ácido acetilmurámico y la acetilglucosamina. En la segunda los precursores se unen para formar un pentapéptido – disacárido que es transportado a través de la membrana celular hasta el lugar que ocupa en la pared celular, la tercera etapa consiste en la unión transversal de las cadenas de péptidos glucanos, este tipo de enlace es el que le da la fuerza tensora y el que capacita para soportar la membrana celular. En la cuarta etapa las cadenas de glucopéptido lineal son unidas en forma cruzada por un paso de transpeptidación en el cual se forma un puente peptídico entre dos cadenas adyacentes con eliminación de la D – alanina terminal. La unión lábil C–N en el anillo β - lactámico se encuentra en la misma posición que la unión peptídica involucrada en la transpeptidación. Así se ha propuesto que los β - lactámicos actúan como un análogo del sustrato de la transpeptidación normal, estos se combinan con la transpeptidasa y por lo tanto la inactiva. ^{8,24}

Esto hace que se bloquee la tercera fase de la síntesis del peptidoglicano. Una vez que se pierde la pared y entonces penetra el agua al espacio intracelular y por diferencia osmótica hay salida de los elementos intracelulares.

Cefotaxima .- pertenece a este grupo y cuyo espectro de acción es sobre *Haemophilus influenzae* , neumococo y enterobacterias.

Aminoglucósidos.- Son antibióticos de espectro reducido y predominantemente bactericidas ¹⁵ . Grupo de antibióticos que actúan sobre Gram. negativos. Estos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas al fijarse a proteínas ribosómicas específicas de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano por medio de ^{15,28}:

- a) Inhiben el comienzo de síntesis proteica.
- b) Impiden alargamiento de cadena polipeptídica.
- c) Elevan la frecuencia de lecturas erróneas del código genético, lo cual da como resultado, proteínas estructurales anormales. Por tanto se incapacita a la bacteria para producir proteínas vitales. Entre este grupo esta la AMIKACINA. ^{9,24,26}

La amikacina es un aminoglucósido semisintético eficiente contra *Pseudomonas aeruginosa* y contra cepas resistentes a gentamicina.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

5.1.1 Realizar el estudio de las botellas FAN utilizando el sistema de detección microbiana BACT/ALERT, con el fin de determinar el efecto de sus componentes sobre el desarrollo de los microorganismos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Realizar la evaluación de la botella FAN (aerobia y anaerobia) y comprobar si facilita la detección de los microorganismos causantes de bacteremias, septicemias o fungemias en pacientes pediátricos.

5.2.2 Determinar el comportamiento de cada microorganismo mediante la ayuda de una curva de crecimiento evaluando uno de los metabolitos producidos (CO₂).

5.2.3 Determinar el tiempo de detección positivo de las botellas FAN de acuerdo a los componentes (Ecosorb, tierra de Fuller's, Carbón activado) del medio para la rápida recuperación de microorganismos y su posterior identificación.

5.2.4 Comparar los tiempos de detección entre las botellas PEDI-BAC y las FAN (aerobias y anaerobias).

5.2.5 Comprobar si la neutralización de antibióticos por los componentes en el medio ejercen dicha acción y permiten evaluar el hemocultivo (positivo o negativo).

5.2.6 Determinar las ventajas y desventajas que presentan el uso de las botellas FAN y el sistema de detección microbiana BACT/ALERT.

6.0 MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre humana

Cepa :	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Brucella abortus</i>	INP
<i>Candida albicans</i>	14053
<i>Clostridium perfringens</i>	INP

Botellas FAN (Aerobio)

Caldo infusión cerebro corazón

Polianetolsulfonato de sodio

Piridoxina HCL

Hemina

Carbón activado

L-Cisteína

Aminoácidos

Carbohidratos

H₂O purificada

Botellas FAN (Anaerobio)

Caldo infusión cerebro corazón

Polianetolsulfonato de sodio

Piridoxina HCL

Hemina

Ecosorb

L-Cisteína

Aminoácidos

Carbohidratos

H₂O purificada.

MATERIAL DE VIDRIO

Matraces erlenmeyer de 125 ml (PYREX)

Probetas graduadas de 100 ml (KYMAX)

Tubos de ensaye 15 x 75 (KYMAX)

Vasos de precipitado de 200 ml (PYREX)

Tubos de rosca estériles 13 x 100 (PYREX)
Tubos celda para Klett de 10 ml (PK)
Portaobjetos (MADESA)
Frascos de vidrio ámbar

OTROS

Jarra Gaspack (SYSTEM)
Micropipetas de (1000 , 100 , y 40) μ l (LABSYSTEM)
Cajas petri (TECHNICARE)
Catalizadores de paladium
Algodón
Mechero
Pinzas
Puntas para micropipetas (azules y amarillas) estériles
Guantes desechables
Cubrebocas
Contenedores para desechos (BD)
Jeringas (1,3,5,10,209 ml
Agitador magnético ()
Filtros Supor Acrodisc 0.45 μ m
Agujas (YALE BD)
Asa bacteriológica
Gradilla

EQUIPO

Klett (SUMMERSON)
Sistema BACT/ALERT (ORGANON TEKNIKA)
Cuarto estufa (IND. KROYLIT)
Refrigerador (NIETO)

Microscopio (OLYMPUS)

Horno (HERAEUS)

Balanza analítica (KERN)

MEDIOS DE CULTIVOS Y ANTIBIOTICOS

Caldo Müller Hinton (DIFCO)

Caldo tioglicolato (DIFCO)

Agar base sangre (DIFCO)

Agar Mackonkey, Sabouraud, Brucella, Sales manitol, Casoy (DIFCO)

Medios semisólidos : SIM , Kligler (DIFCO)

Antisueros contra *Brucella abortus* (DIFCO)

Botellas FAN aerobias (ORGANON TEKNIKA)

Botellas FAN anaerobias (ORGANON TEKNIKA)

Botellas PEDI-BAC (ORGANON TEKNIKA)

Antibióticos : Cefotaxima 20 mg/ml (BRISTOL)

Amikacina 20 mg/ml (GROSSMAN)

REACTIVOS:

Alcohol etílico al 70 % (SIGMA)

Hipoclorito (QUIROMED)

Generadores de anaerobios (Gas pack) (BBL)

Indicadores de anaerobiosis (Tiras de azul de metileno) (MERCK)

Aceite de inmersión (MERCK)

Anticoagulante Citrato de sodio al 3.8% (MERCK)

Reactivos para nefelómetro de McFarland.

7.0 METODO

PREPARACIÓN DEL INÓCULO.(1)

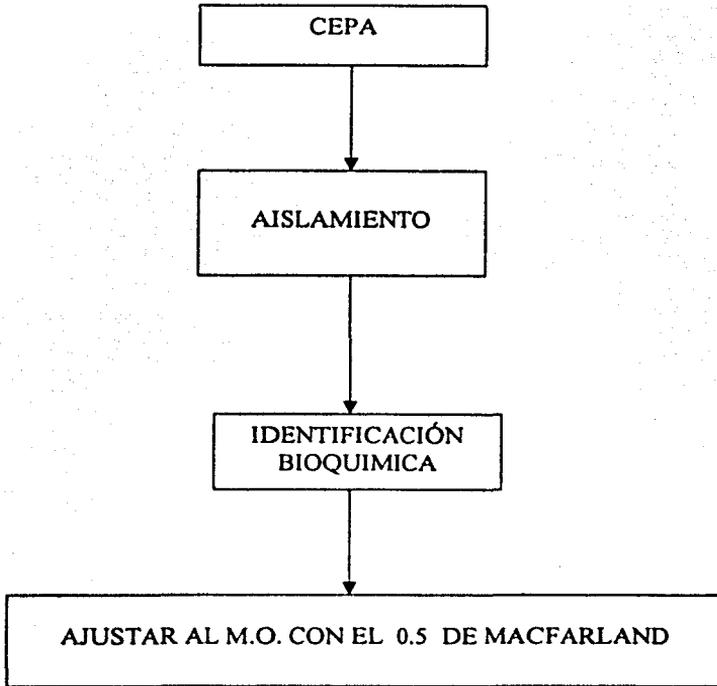
Se partió de una cepa de colección del laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría(INP), donde se encontraba concentrada de acuerdo al caso : cepas ATCC en su forma liofilizada, fue resuspendida en caldo de BHI (infusión cerebro corazón) como en el caso de *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, y *C.albicans*. En las cepas INP concentradas en un medio de conservación de glicerol al 40% (BHI 60/40 glicerol), para *B.abortus* y *C.perfringens* en caldo de BHI en condiciones anaerobias. Todas fueron recheckadas para comprobar su viabilidad y pureza, para ello se sembraron en medios selectivos de cultivo de acuerdo a la especie del microorganismo empleado. Se utilizó Agar Sales Manitol (*S.aureus*), Agar MacConkey (*E.coli* y *P.aeruginosa*), Agar Brucella (*B.abortus*), Agar base sangre + sangre de carnero 5% con hemina y menadiona (*C.perfringens*).

Aislado el microorganismo este, se sometió a la identificación bioquímica y serológica, según el caso, donde se empleo un antisuero contra el antígeno O (DIFCO) específico para *Brucella abortus*.

Conocida la pureza y probada la identificación de la cepa, esta se sembró en Agar Müeller - Hinton y se incubaron a 37°/24 horas, para la obtención de colonias jóvenes, las cuales posteriormente se suspendieron en caldo Müsèller-Hinton para alcanzar la concentración de 0.5 McFarland y así preparar las diluciones correspondientes a : 1/100 (62.5 Y 31.2 UFC/ml), 1/1000 (62.5 Y 31.2 UFC/ml), 1/10000 (6.25 Y 3.12 UFC/ml), 1/100000 (0.062 Y 0.03 UFC/ml). (Ver diagrama No.1).

8.0 DIAGRAMA DE TRABAJO *IN VITRO* (1)

PREPARACION DE LA CEPA PARA SU UTILIZACION



ESQUEMA DE TRABAJO.(2)

Del 0.5 de McFarland se realizó la dilución de cada microorganismo a 1/100 y así se prepararon los sistemas a emplear sangre como control negativo, sangre + microorganismo, sangre + amikacina + microorganismo, y sangre + cefotaxima + microorganismo, de estos cuatro sistemas se tomaron volúmenes de 0.25 ml, 0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, y 2.0 ml, para ser inoculados en condiciones adecuadas de acuerdo al microorganismo (aerobias o anaerobias) en las botellas FAN.

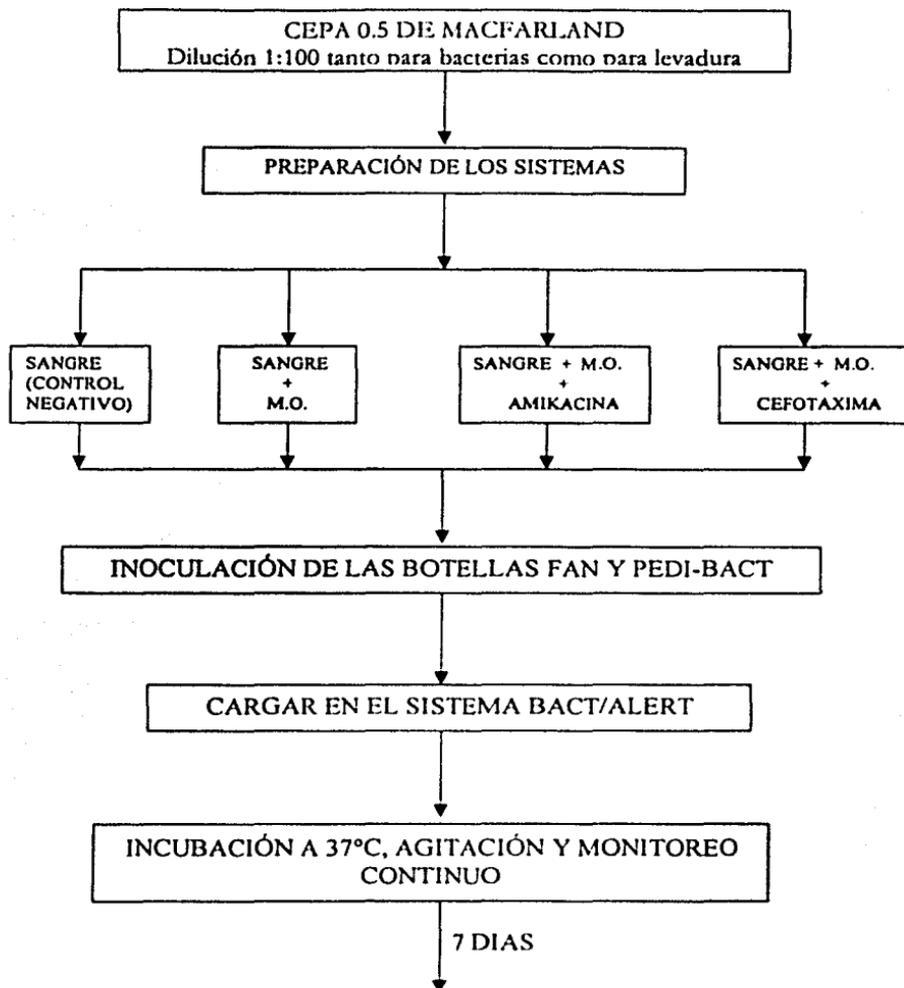
En el caso de las botellas PEDI-BACT se empleó solo un volumen de 0.5 ml .

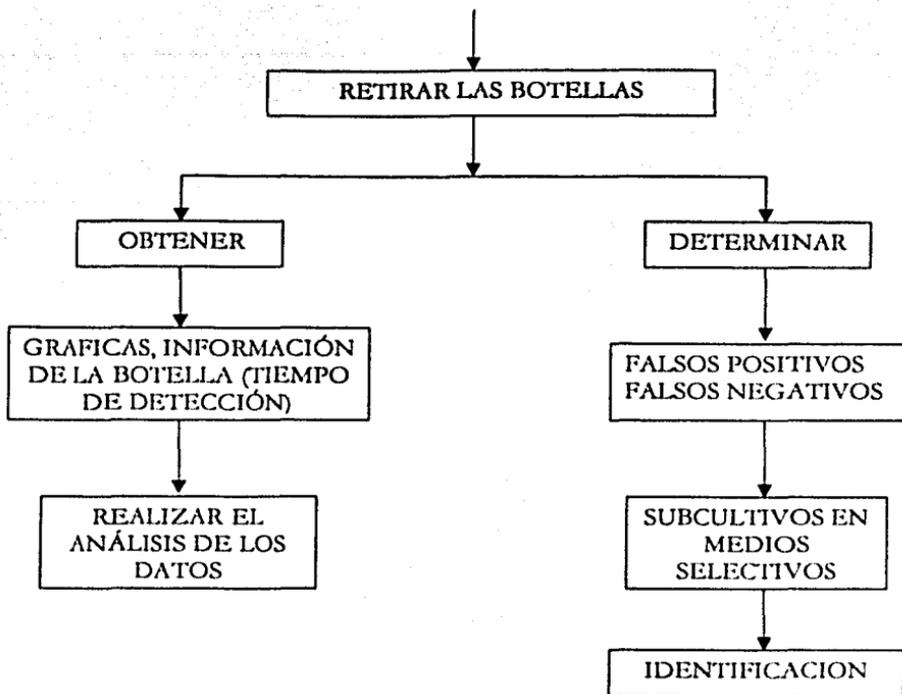
Posteriormente las botellas se dieron de alta en el sistema BACT/ALERT a través del código de barras que presentan las botellas, una vez ingresadas al sistema se incubaron a 37°C, sometidas a agitación y a ser monitoreadas a partir de ese momento, cada 10 minutos por 7 días.

Cada lectura fue registrada y almacenada por la computadora para cada botella. Al término de los siete días las botellas se retiraron y se determinaron los falsos positivos y falsos negativos al realizar subcultivos de todas las botellas en medios selectivos (Agar sales manitol, Agar McConkey, Agar Sabouraud, Agar sangre de carnero 5% + hemina + menadiona), para su identificación así como comprobar la pureza de la cepa.

Al mismo tiempo se obtiene la información de la computadora por botella, esto es: tiempo de detección, gráfica de crecimiento e Índice de positividad para su posterior análisis. (Ver diagrama No.2)

8.1 DIAGRAMA DE TRABAJO *IN VITRO* (2)





NOTA: LOS VOLUMENES FINALES EMPLEADOS EN CADA SISTEMA SON LOS SIGUIENTES:
(0.25 , 0.5 , 1.0 , 1.5 Y 2.0) ml

9.0 RESULTADOS

FIG 12-19 .- Las figuras que se muestran son las correspondientes a la curva de crecimiento bacteriana de cada una de las especies utilizadas en el presente estudio, dicha curva es construida de manera indirecta basándose en el metabolismo bacteriano (producción de CO₂). El tiempo de detección máximo de monitoreo para las botellas es de siete días de acuerdo a la programación del equipo, lo cual respaldado por estudios previos indica que mientras haya microorganismos viables presentes en el medio, será suficiente para que haya desarrollo y por consecuencia una suficiente producción de CO₂ ,lo cual provocara un vire del color en el sensor y esta botella sea determinada como positiva.

El tiempo de generación bacteriana varía de una especie a otra, hecho que se comprueba al revisar las gráficas de crecimiento donde la que pertenece a *Escherichia coli*, se dispara de manera rápida en un tiempo de aproximadamente 4 horas y por ende la gráfica presenta un gran salto de las unidades de reflectancia iniciales (ver figura 13).

S.aureus presento un tiempo de 11-12 horas para producir CO₂ suficiente y ser detectado , lo que gráficamente se observa en unidades de reflectancia y estas al ser comparadas con las de *E.coli* son menores. (Ver fig 12).

P.aeruginosa presentó cambios en promedio de tiempo de 12-14 horas, además de presentar una curva poco pronunciada y muy característica , lo que indica que su producción de CO₂ no es tan elevada , por lo que se debe de tener cuidado para que no pase desapercibida cuando no haya condiciones favorables. (Ver fig. 14 Y 15).

B.abortus presenta una curva de crecimiento similar a la de *Pseudomonas*, solo que a excepción de esta, el tiempo para ser detectada es mayor (aproximadamente de 37 horas en promedio), y el cambio que sufre la curva es mínimo para ser determinada como positiva la botella, permaneciendo constante hasta que es retirada del equipo. (Ver fig 16). Sin embargo, por ser este un microorganismo fastidioso para su recuperación en el laboratorio se considero basándose en antecedentes, que el tiempo de recuperación es de 20-30 días por su lento crecimiento y por tanto en un primer ensayo se programó a 30 días, pero la gráfica que se presento es idéntica a la ya mencionada perteneciente a un tiempo más corto. (Ver fig.17),por lo tanto la curva es característica del microorganismo.

Candida albicans presentó un tiempo de detección entre 29 y 36 horas para ser detectado por el equipo como positivo y la curva de crecimiento siguió registrando incremento en las unidades de reflectancia lo que indica que el microorganismo sigue desarrollando y por tanto produciendo CO₂, curva que se caracterizo en todos los casos donde se encontraba el microorganismo.(Ver fig.18).

Clostridium perfringens es un microorganismo anaerobio cuya curva de crecimiento evidencia que en condiciones favorables produce una gran cantidad de CO₂, lo cual justifica que las unidades de reflectancia se incrementen en un tiempo corto(14-56 horas), la curva obtenida también se presento de manera característica en todos los casos (Ver fig. 19).

Por ser muy idénticas las curvas de crecimiento para cada microorganismo aunque hubiera antibiótico presente, es la razón para mostrar solo una figura de cada especie.

GRAFICAS CORRESPONDIENTES AL METABOLISMO BACTERIANO DE LOS GENEROS EN ESTUDIO.

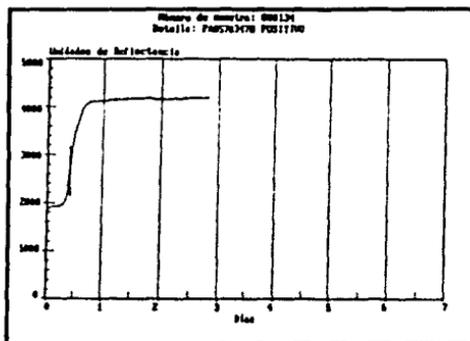


FIG. 12 *Staphylococcus aureus*

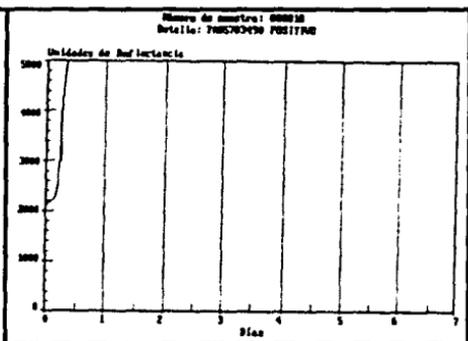


FIG. 13 *Escherichia coli*

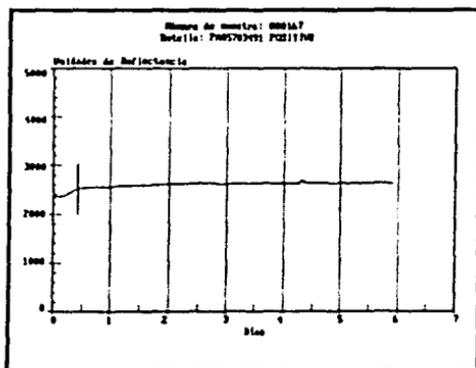


FIG. 14 *Pseudomonas aeruginosa*

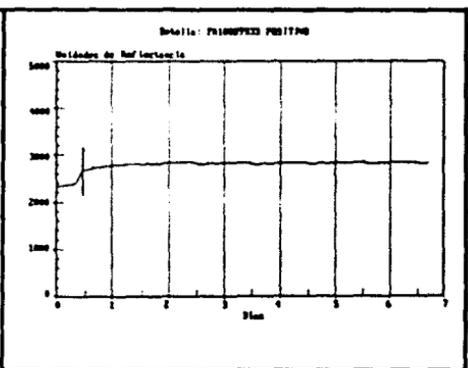


FIG. 15 *Pseudomonas aeruginosa*

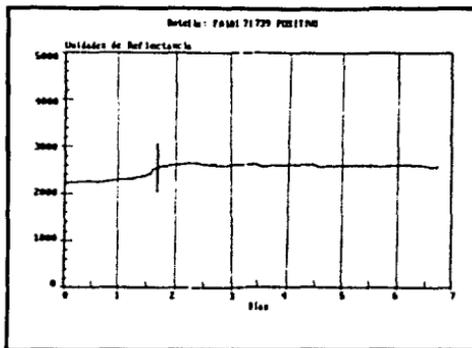


FIG. 16 *Brucella abortus* (7 días)

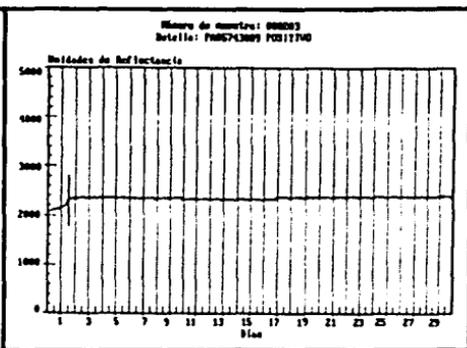


FIG. 17 *Brucella abortus* (30 días)

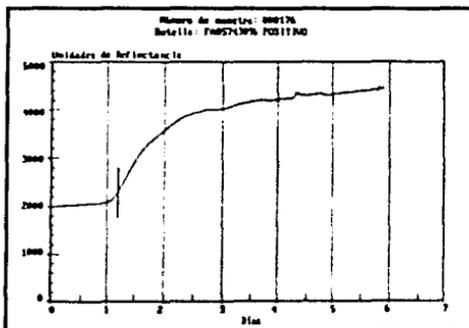


FIG. 18 *Candida albicans*

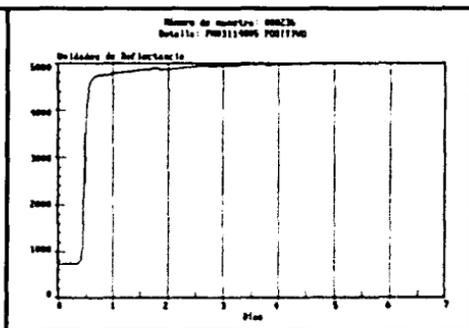


FIG. 19 *Clostridium perfringens*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para poder mostrar mas entendiblemente los microorganismos en estudio se separaron en tres grupos: a) anaerobios facultativos, b) aerobios y c) anaerobios estrictos.

A) ANAEROBIOS FACULTATIVOS:

Fig. 20 Nos muestra a la *Escherichia coli* cuyo comportamiento indica, que el tiempo de detección es más corto en los sistemas donde está la bacteria presente, esto al ser comparado contra el control (sangre), el cual fue retirado hasta el tiempo máximo de 7 días (168 horas). Los tiempos obtenidos en donde había bacteria fueron: sangre + bacteria + amikacina de 3.5 hrs y en el caso de cefotaxime presente de 5.0 horas, este último es ligeramente más largo que los anteriores, debido al espectro de acción de dicho antibiótico sobre las bacterias Gram. negativas . El volumen cuya variable es de gran importancia en el estudio, no presento una diferencia significativa ($P=0.9997$) en el empleo de volúmenes pequeños de muestra, ya que el comportamiento de la bacteria, así como el tiempo de detección son parecidos, por lo que, en caso de esta enterobacterias se pueden utilizar volúmenes pequeños para su detección, siempre y cuando estén viables los m.o presentes, ya que la rapidez de su metabolismo es lo que se refleja en el tiempo de detección.

Fig: 21 En caso de *Staphylococcus aureus* su tipo de metabolismo le permite ser detectado rápidamente, porque al observar la gráfica podemos decir que el comportamiento es idéntico en todos los volúmenes empleados aunque estos sean pequeños (0.25 ml,0.5 ml) , el tiempo no se vio afectado por el antibiótico presente tal vez por que a pesar de ser la cefotaxima una cefalosporina de tercera generación no tiene mucho efecto sobre los cocos positivos. Por tanto la diferencia entre los volúmenes no es significativa y los tiempos obtenidos fueron de 8.5 horas a 10.0 horas.

.En cuanto al tiempo, este va a variar dependiendo del inóculo (densidad bacteriana), y volumen, los cuales tienen una relación inversamente proporcional, lo cual es altamente significativo ($P=0$).

En este caso el tiempo se puede englobar en un rango (8.6-10.75 horas), ya que este no presenta una variación significativa (0.965), aun en presencia de antibiótico. Este tiempo es similar debido a la acción neutralizante sobre el antibiótico por parte del carbón activado y del ecosorb, tierra de fuller's.

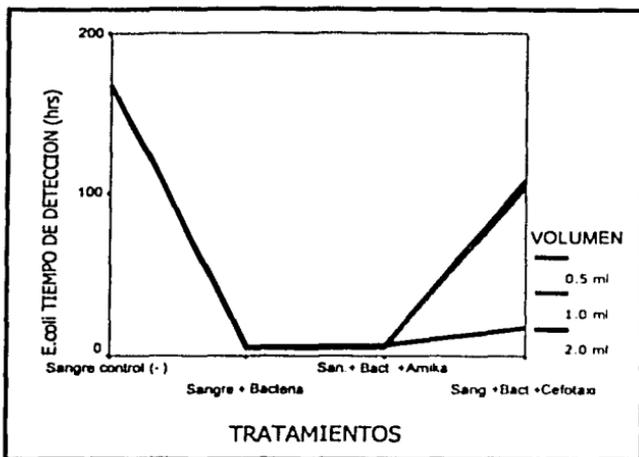


FIG. 20.

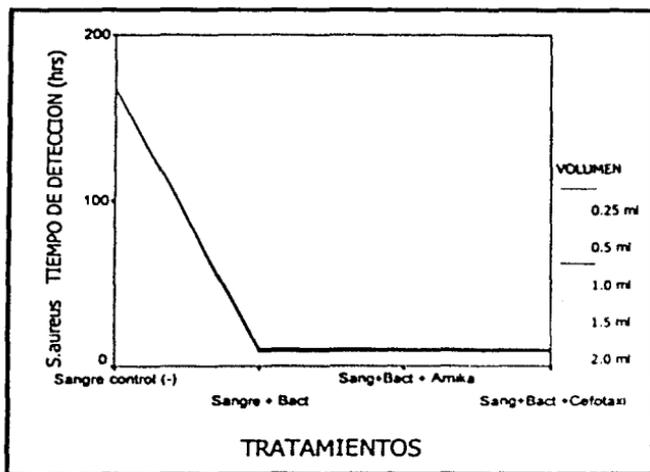


FIG. 21

Fig : 22 y Fig 23 .- En estos gráficos podemos evaluar el crecimiento de estos m.o. en los dos tipos de botellas aerobias y anaerobias, cuya diferencia radica en la composición de la atmósfera de las mismas. Debido al tipo de m.o que se tratan cuyo metabolismo es facultativo, es decir, que se puede desarrollar tanto en condiciones aerobias como anaerobias, este comportamiento se puede observar en ambos gráficos, y cuyos tiempos de detección son similares haya o no presencia de antibióticos, por lo que se puede utilizar una u otra botella para su detección.

Al analizar los datos, podemos observar que la recuperación del *E.coli* no depende de la atmósfera, por lo que tienen una diferencia no significativa ($P=0.954$), esto es al hacerla crecer en ambos ambientes atmosféricos (aeróbico, anaeróbico).

Staphylococcus aureus a su vez, crece sin ningún impedimento en las dos atmósferas, lo cual se comprueba con su diferencia altamente significativa ($P = 0$)

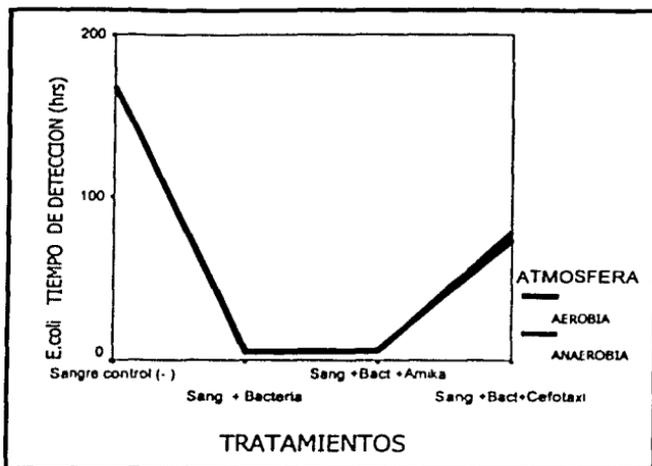


FIG. 22

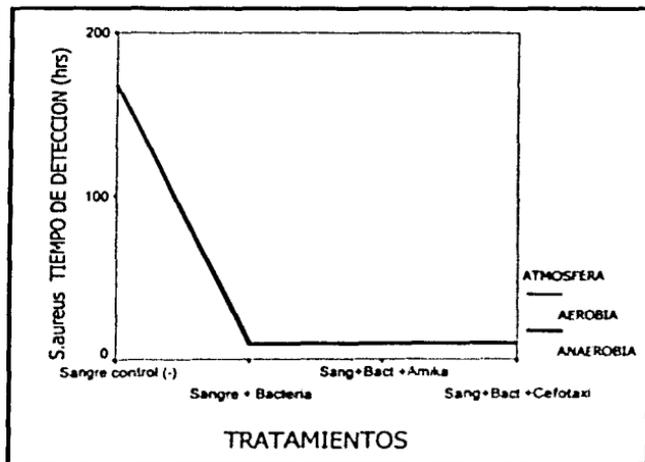


FIG. 23

B) AEROBIOS

Fig. 24 La *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo de lento crecimiento lo que hace difícil su determinación, tal y como lo muestra el gráfico, en condiciones adecuadas de atmósfera principalmente crece haya o no presencia de antibióticos. La variable volumen, nos permite apreciar que en 0.25 ml, 1.5 ml y 2.0 ml el comportamiento es similar, debido a que el tiempo que registraron fue el máximo de 7 días, sin embargo, en los subcultivos terminales que se hicieron si hubo desarrollo dando pie a pensar que el m.o si estuvo presente en el medio, pero que la atmósfera no fue suficiente para hacer el desarrollo evidente, dando como consecuencia, hemocultivos falsos positivos y como consecuencia una prolongación en el tiempo de detección. En casos donde se aerearon las botellas (3-5 minutos), el crecimiento no se hizo esperar, obteniéndose un tiempo de 10.2 horas para el volumen de 0.5 ml y de 32.2 horas. Para el de 1 ml, de acuerdo con estos resultados si se pueden emplear volúmenes pequeños para la recuperación de este m.o. causal, siempre y cuando se le proporcione el oxígeno necesario para su desarrollo. En cuanto al volumen, se puede emplear cualquiera de los utilizados en los sistemas, siempre y cuando, los microorganismos estén viables y estandarizados a la concentración planteada en un inicio. ($P=0$). Pero en casos de 0.25 ml no se recomienda debido a que no es muy confiable.

Fig. 25.- Al igual que en *Pseudomonas aeruginosa* los tiempos para *Brucella abortus* no son favorecidos si no hay una aereación de la botella, considerando esto se realizó dicho proceso 3 minutos y como resultado se obtuvo un desarrollo en los sistemas incluyendo a los de antibióticos, dejando claro que mientras haya m.o. viables no importa el volumen, ya que en este caso se logró una detección en todos los volúmenes empleados (0.25 ml, 0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, 2.0 ml), teniendo así como resultado en el sistema donde había amikacina un tiempo casi igual en los volúmenes de 0.25 ml y 1.0 ml (39.8 horas y 36.3 horas respectivamente) y en los de 0.5, 1.5 ml y 2.0 ml de 40.2 horas, 34.7 horas y 35.3

horas respectivamente, para el sistema de cefotaxima presente, el tiempo fue de 40.2 horas para el volumen de 0.5 ml. Una vez más se logra apreciar la acción del carbón activado, tierra de fuller's del medio de cultivo ya que permite el crecimiento microbiano.

En cuanto al volumen se puede utilizar cualquiera de los planteados en el inicio para la recuperación del microorganismo, ya que a esa concentración se puede detectar el desarrollo. ($P=0.999$) .

Como ya mencionamos, el tiempo es lo que interesa en este ensayo y este se determinó en horas. Nuevamente se observa que al ser aereada la botella el tiempo disminuye, en los sistemas donde habla antibiótico. El tiempo fue de 37.14 horas, en presencia de amikacina, el tiempo promedio fue de 36.62 horas, pero cuando no hay suficiente aire (3 minutos de aereación) el tiempo de detección fue de 142.9 horas en presencia de cefotaxima.

Fig. 26 En caso de *Candida albicans* En el ensayo se aumento el tiempo de aereación a 5 minutos para aumentar la concentración de oxígeno en el medio obteniéndose así tiempos similares en todos los sistemas de 27.2 horas a 36.2 horas. Nuevamente el volumen no es una variable determinante para la detección de este microorganismo puesto que se recuperó en un tiempo razonable.

En cuanto al volumen, se puede utilizar cualquiera (0.5 a 2.0 ml), mientras el inóculo sea suficiente, además de ser viable. ($P= 0.606$) , se confirma al observar que la diferencia entre ellos es no significativa.

En cuanto al tiempo es de 29.2 a 36 hrs. en promedio haya o no antibiótico presente, ya que los antibióticos presentes no tienen ninguna acción sobre el microorganismo, lo indicado hubiera sido utilizar un antimicótico, sin embargo, por cuestiones de presupuesto no fue posible.

Una vez más, en las botellas no aereadas se observa un tiempo de detección de 7 días como máximo y al igual que en los dos casos anteriores pueden darse falsos negativos. La confirmación de la presencia del microorganismo se realizó utilizando Agar Sabouraud.

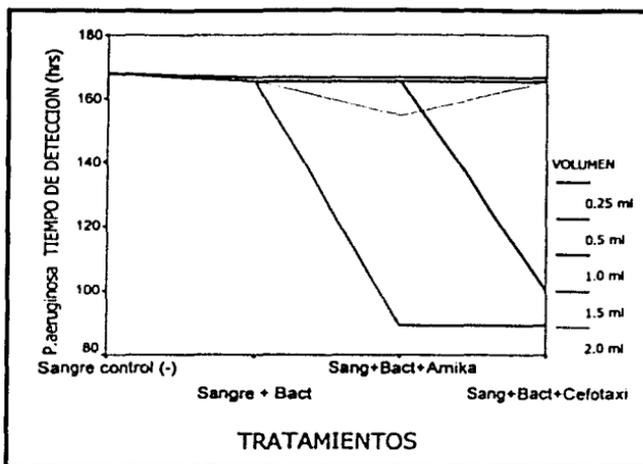


FIG. 24

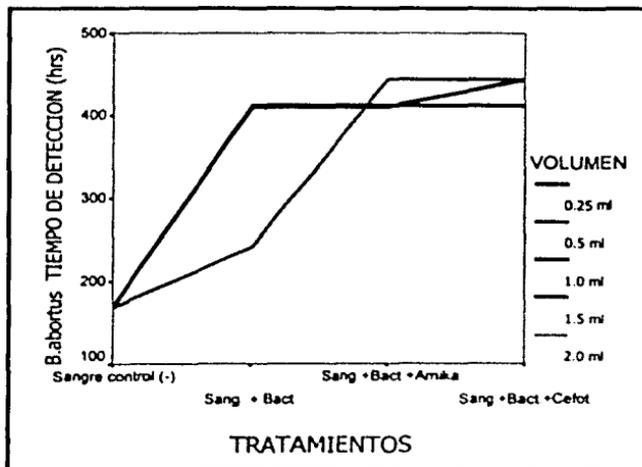


FIG 25.

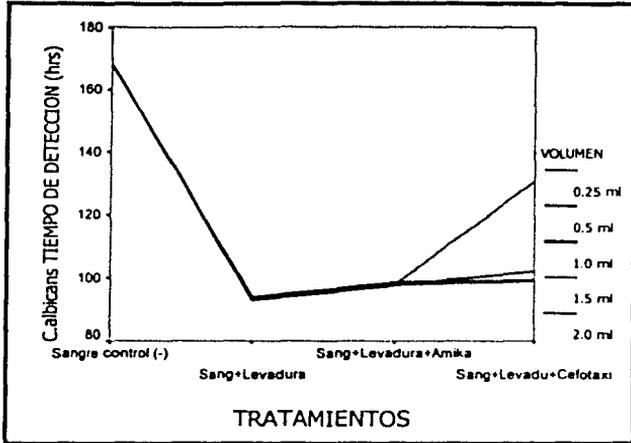


FIG 26.

Fig. 27 La *Pseudomona aeruginosa* como ya lo mencionamos es de metabolismo aerobio y oxidativo por lo que utiliza solo al oxígeno como último aceptor de electrones, por tanto este microorganismo requiere de este elemento para su crecimiento, aunque este no es el único proceso metabólico que puede utilizar, ya que como alternativa en ausencia de oxígeno, emplea al nitrato como último aceptor, pero su crecimiento es más bajo.

Esto se ve reflejado en los hemocultivos en el tiempo de detección, es decir, que al ser aereados, el microorganismo crece más rápidamente y su tiempo promedio es de 12.8 horas. , aunque haya antibiótico presente. No siendo el mismo caso donde hubo poco tiempo de aereación por lo que el tiempo promedio va desde 106.89 a 163.6 horas. . Pero cuando no son aereados los hemocultivos tardan más de 7 días o bien el equipo los determina como negativos aunque la bacteria este presente.

Debido a lo anterior el factor atmosférico es de gran importancia y esto se aprecia al analizar los datos y ver que la probabilidad de crecimiento es altamente significativa ($P= 0.$), por lo que si hay diferencia en el crecimiento en ambas atmósferas.

Fig 28 La *Brucella abortus* es un m.o fastidioso y lento en su crecimiento, por lo que la atmósfera es muy importante y su tiempo de detección disminuye al encontrar oxígeno disponible.

Brucella al igual que *Pseudomonas* cuenta con un metabolismo oxidativo, es aerobio estricto, por tanto este microorganismo depende del factor atmosférico, lo que se ve reflejado en el tiempo. La probabilidad es de ($P= 0.934$), la cual no es significativa, indicándonos que la atmósfera es importante para su desarrollo.

No siendo el caso de aquellos frascos que no se aerearon por lo que al estar programados a 30 días, las botellas se determinaron como negativas por el equipo. Sin embargo, estos falsos negativos se confirmaron en las resiembras realizadas en Agar Brucella, y su tiempo de crecimiento fue de 72 horas.

Fig. 29 La *Candida albicans* por ser una levadura es una célula eucariótica cuya respiración es aerobia obligada para su crecimiento tal y como es comprobado en el comportamiento observado en el gráfico, donde los tiempos son un reflejo de ello (27.2 horas a 31.3 horas). Este microorganismo por sus características celulares, tiene un metabolismo aerobio, por lo que se requiere oxígeno para su desarrollo. Estadísticamente hablando la probabilidad de crecimiento se ve afectada con la atmósfera ($P= 0$), esta se observa que es altamente significativa, y por tanto si hay diferencia entre una y otra afectando la detección del hemocultivo y por ende su identificación.

Los hemocultivos no aereados presentan un tiempo más prolongado, incluso de 7 días (168 horas), al ser determinados por el equipo como negativos, mientras que en las resiembras en agar Sabouraud mostraron lo contrario.

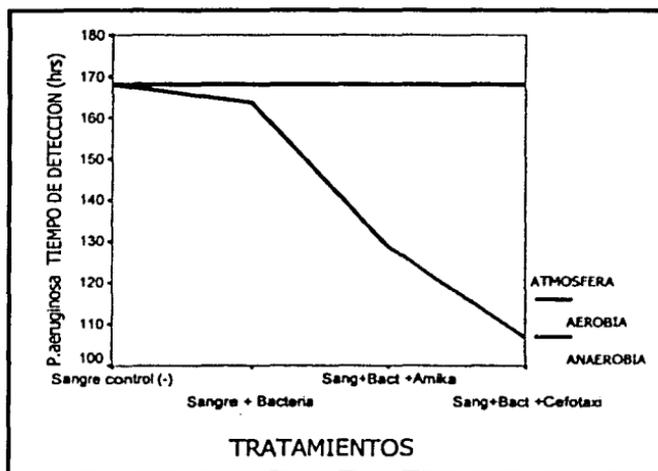


FIG. 27

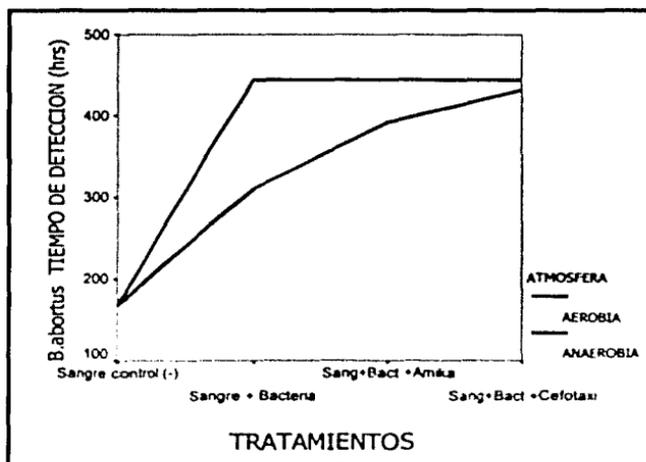


FIG. 28

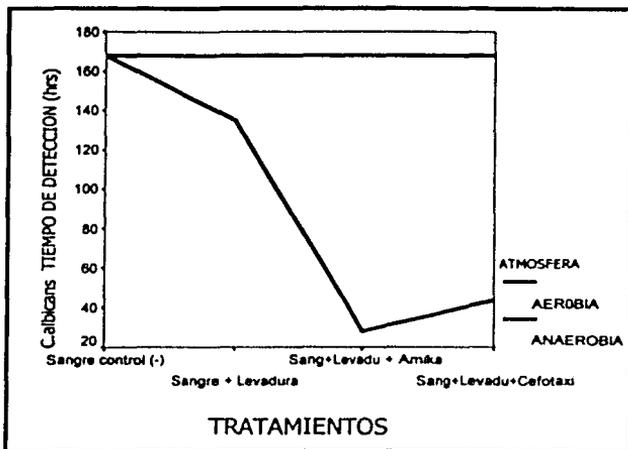


FIG. 29

Q)ANAEROBIO ESTRICTO

Fig 30 Los anaerobios son de un manejo más delicado para su recuperación, sin embargo, es posible recuperarlo al evitar algunos factores que pueden afectar su desarrollo. Una buena inoculación en la botella (ausencia de burbujas) favorece el crecimiento. La presencia de antibióticos no influye en la detección del microorganismo, aunque en el sistema donde hay cefotaxima el tiempo es más prolongado (13.5 horas – 2.8 días) que en el caso de amikacina presente (8.7 horas a 10.8 horas), el volumen no fue un factor importante que impida la recuperación del microorganismo, por tanto se puede utilizar desde un volumen pequeño (0.25 ml) hasta uno mayor (2.0 ml). Con respecto al volumen se puede emplear cualquiera de los utilizados a ese inóculo, puesto que hay recuperación. La diferencia es no significativa ($P= 0.499$).

Fig 31 La atmósfera es de gran importancia para la recuperación del m.o., ya que como podemos ver en el gráfico, el desarrollo del m.o. se favorece al estar en condiciones anaeróbicas, esto por el metabolismo que presenta, debido a que éste utiliza SO_4^{2-} como último aceptor de electrones y por tanto no ser aerotolerante³³. La presencia de oxígeno, significa no desarrollo y como consecuencia muerte del microorganismo, repercutiendo en el tiempo de detección siendo este corto.

Todo lo anterior repercute en el tiempo, es decir, cuando el microorganismo está en condiciones aeróbicas, el tiempo máximo es de 7 días y por tanto el hemocultivo se da como negativo. En condiciones anaeróbicas hay desarrollo, observando una diferencia altamente significativa ($P= 0$). El tiempo fue para el microorganismo más sangre de 14.23 hrs. Y en el caso de los sistemas con antibióticos fue de 14.46 hrs. en presencia de amikacina y de 56.15 horas en el caso de cefotaxima.

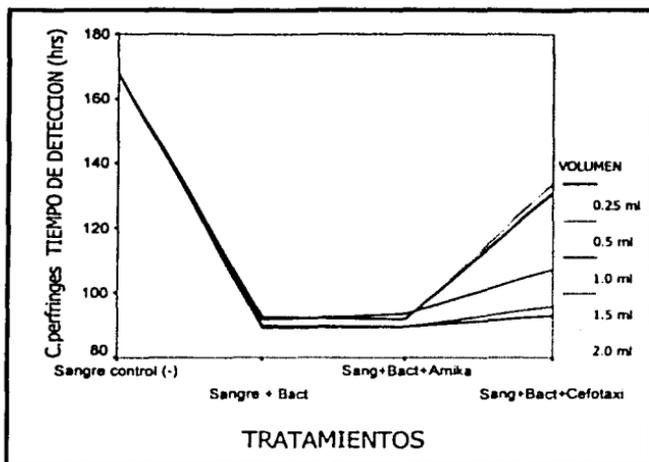


FIG. 30

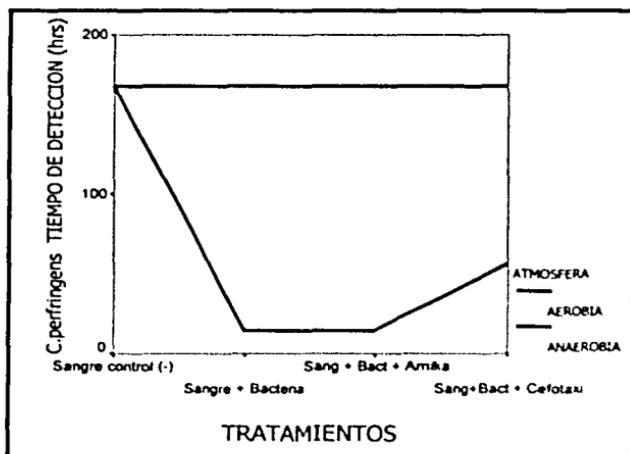


FIG. 31

COMPARACIÓN ENTRE LAS BOTELLAS FAN Y PEDI-BACT CON RESPECTO A TIEMPO DE DETECCIÓN

A) ANAEROBIOS FACULTATIVOS

Para comprobar la función de los componentes nuevos que caracteriza a las últimas botellas producidas para el BACT/ALERT, se realizó una comparación entre las FAN y las PEDI-BACT ya existentes para pacientes pediátricos.

FIG.- 32 En caso de *Escherichia coli*, se observa un comportamiento similar en ambas botellas en cuanto a crecimiento, pero un poco menor en unidades de reflectancia (U.R.), siendo estas las que el equipo reporta como signo de evidencia de crecimiento bacteriano, en la botella FAN que en la PEDI-BACT en el sistema donde hay cefotaxima, lo cual repercute en el tiempo de detección, el cual es mayor que en los otros sistemas. La diferencia en estas unidades de reflectancia no es significativa, ya que el tiempo de detección es similar en ambas botellas (9.3 horas para FAN Vs 8.8 horas de PEDI-BACT). Por tanto el efecto dilución no influye en la detección del microorganismo.

Los tiempos entre los tratamientos son similares en ambas botellas (8.3 – 10.1) para los sistemas donde no hay antibiótico y amikacina presente respectivamente, en caso de cefotaxima, los tiempos fueron más largos (141.6 horas). Para este microorganismo no hubo una diferencia significativa en cuanto al tiempo (P=0.546), por lo que se puede utilizar una botella u otra para su recuperación.

FIG. 33 Para el caso de *Staphylococcus aureus* el comportamiento es prácticamente el mismo, por lo que el tiempo en todos los sistemas donde hay bacteria presente es el mismo (11.7 horas para PEDI-BACT Vs 11.8 horas en FAN). Nuevamente la recuperación del microorganismo no se vio afectada por la dilución, por tanto se puede utilizar cualquiera de las dos botellas para su recuperación al no presentar una diferencia no significativa (P=0.004), por lo que los datos son prácticamente los mismos, tanto entre los tratamientos como en ambas botellas. El rango de tiempo es de 11.5 a 12.5 horas.

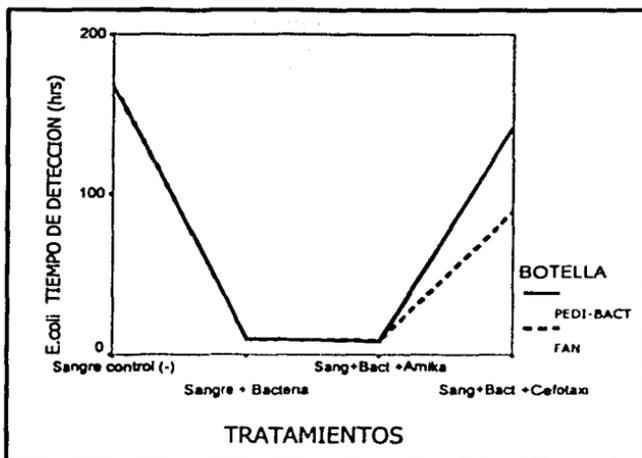


FIG. 32

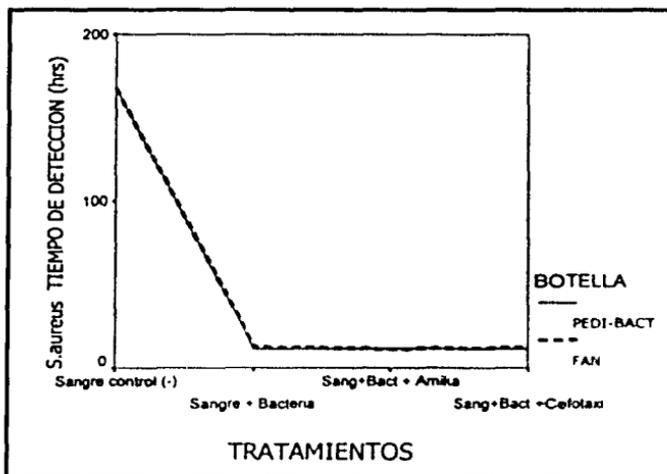


FIG. 33

B)AEROBIOS

FIG. 34 La *Pseudomonas aeruginosa* muestra un comportamiento idéntico en ambas botellas, solo que en la botella FAN, las unidades de reflectancia estuvieron más altas que en la PEDI-BACT como signo de crecimiento, pero esto no repercutió en el tiempo de detección, puesto que fue similar en ambas botellas y en todos los sistemas (12.8 horas para FAN Vs 14.0 de PEDI-BACT). La diferencia entre ellas es No significativa ($P=0.127$), por lo que se puede emplear una u otra para la recuperación del microorganismo. Los tiempos de detección entre tratamientos son similares en todos y van de 12.7 a 14.5 horas. Sólo hay que tener en cuenta la aereación del frasco.

FIG. 35 La *Brucella abortus* un tiempo de detección más prolongado en el sistema donde solo había sangre + bacteria en la botella FAN (7 días) que en la PEDI-BACT (30.8 horas), esto es posible debido a una mala aereación del frasco, no es el caso para los otros dos sistemas donde había presencia de antibiótico, cuyos tiempos fueron muy cercanos entre ellos. En donde hay amikacina presente, el tiempo obtenido fue de 28.2 horas para FAN Vs 40.horas de PEDI-BACT, mientras que en el sistema de cefotaxima fue de 35 horas para FAN Vs 93 de PEDI-BACT. Pese a lo anterior se puede utilizar cualquiera de las dos botellas al ser estadísticamente su diferencia no significativa ($P=0.689$). Como microorganismo aerobio hay que aerearlo.

FIG. 36 *Candida albicans* presenta un crecimiento similar en las dos botellas , ya que el antibiótico no interfiere en su desarrollo , salvo en el sistema donde hay sangre + levadura el tiempo de detección fue más corto en PEDI-BACT que en FAN (29.2 horas en PEDI-BACT Vs 35.3 horas de FAN) , mientras que en los otros sistemas se obtuvieron tiempos similares oscilando entre 31.5 horas de PEDI-BACT Vs 36.0 horas de FAN . Teniendo esto como consecuencia una diferencia no significativa y por tanto se determina que se pueden utilizar ambas botellas para la detección de este microorganismo.

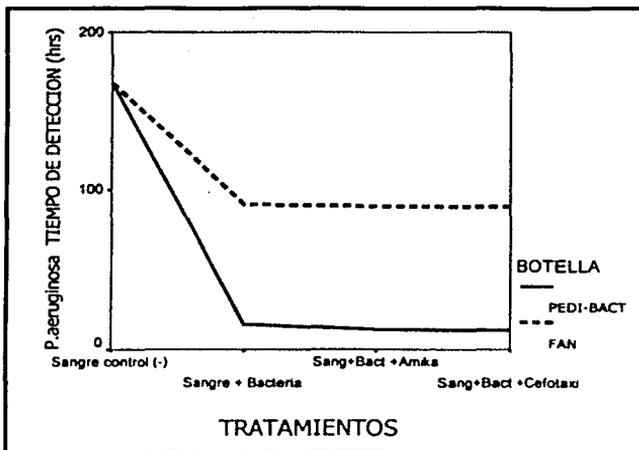


FIG. 34

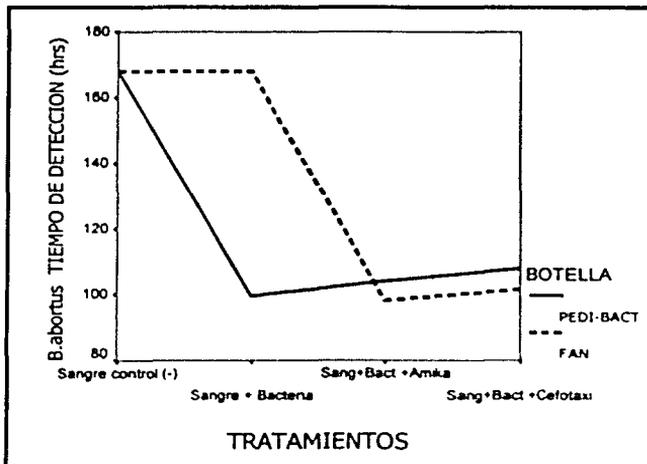


FIG. 35

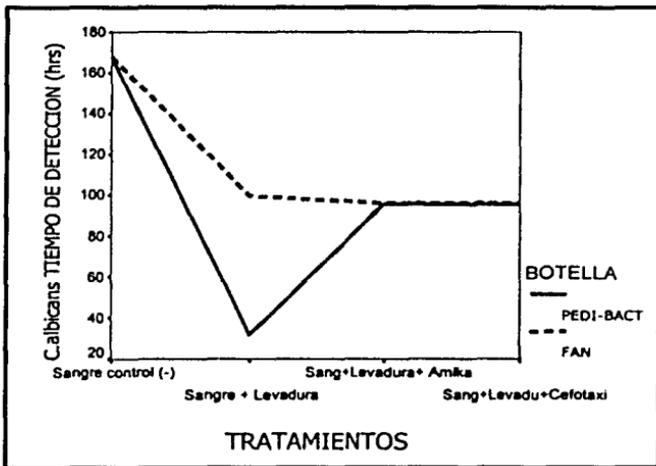


FIG. 36

C) ANAEROBIO ESTRICTO

FIG. 37.- El crecimiento de *Clostridium perfringens* es prácticamente el mismo por lo que los tiempos de detección son similares en ambas botellas y entre sistemas, siendo más prolongados donde hay antibióticos, esto debido a la acción del antibiótico sobre la bacteria, lo cual hace que su fase de adaptación sea más largo, sin embargo, se puede utilizar una u otra para la recuperación del microorganismo, solo que evitando la entrada de aire al frasco para obtener resultados positivos, ya que la diferencia es no significativa entre ellas.

Los tiempos determinados fueron: 15.2 horas para FAN Vs 28.5 horas de PEDI-BACT para el sistema de sangre + bacteria, en presencia de amikacina el tiempo fue de 15.3 horas de FAN Vs 23.2 horas de PEDI-BACT y para cefotaxima de 16.5 horas de FAN Vs 19.3 horas de PEDI-BACT.

La recuperación de este microorganismo se puede llevar a cabo en ambas botellas aunque ligeramente es más adecuada una botella FAN anaerobia (tiempo promedio 16.5 horas) que en PEDI-BACT (donde el tiempo va de 19.3 a 28.5 horas), aunque la diferencia es no significativa ($P= 0.934$). Por lo que solo hay que hacer una buena inoculación del frasco para proporcionarle condiciones favorables y obtener buenos resultados.¹⁸

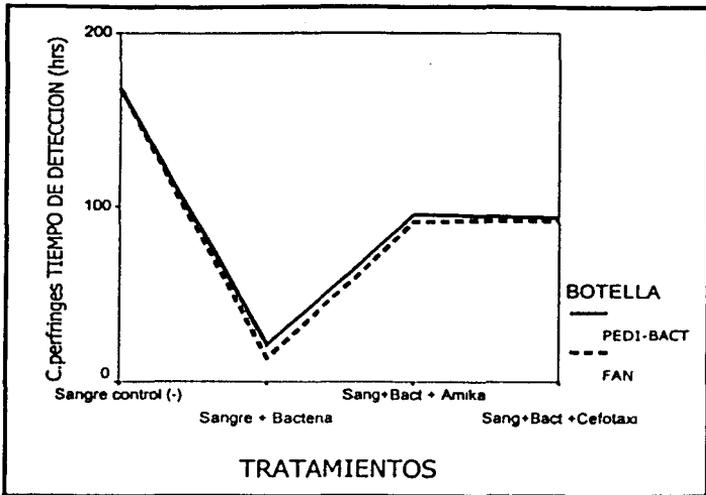


FIG. 37

Tabla 1 y 2.- La sensibilidad de detección del sistema utilizado y la probabilidad de encontrar m.o. en el medio de cultivo, influye en la determinación. Para ello el equipo está diseñado para detectar UFC/ml en pequeña cantidad (1-3 UFC/ml). Respaldao esto por estudios anteriores en los que se detectan hasta 4 UFC/ml en caso de *E.coli* , recuperándose a los hemocultivos en un porcentaje elevado como positivos.³⁰

En las diluciones empleadas el porcentaje de recuperación en hemocultivos probados es alto, ya que con ello se corrobora la sensibilidad de detección del instrumento. Sin embargo los resultados muestran al volumen de 0.5 ml como ideal para la detección de bacteremia o sepsis, en casos pediátricos, siendo este el volumen mínimo de empleo en cada hemocultivo a una densidad bacteriana de hasta 6 UFC/ml esto en caso de *E.coli*, no siendo la misma situación para los demás microorganismos utilizados en el estudio, puesto que para *S. aureus* la densidad bacteriana para su detección fue de 31.2 UFC/ml, y para los aerobios de 62.5 UFC/ml, esto tal vez debido a su lento desarrollo. En caso del anaerobio *C.perfringens* este no se determino más que a una densidad bacteriana de hasta 312 UFC/ml , debido a que después se contamina y ya no se pudo contar con más bacteria (Ver tabla 1).

Por otra parte se confirmo dicha detección mediante el uso de subcultivos terminales, es decir que se realizaron subcultivos en medios selectivos tanto para corroborar que el tiempo de detección de la botella no pertenencia a contaminaciones sino al microorganismo en cuestión, como para detectar que hubiese la presencia de estos en todas las botellas empleadas (tanto positivas como negativas), observándose de esta forma que había botellas determinadas como negativas y que no lo eran al obtener positivos los subcultivos, es decir, que para que un hemocultivo sea dado como positivo debe de tener un índice de positividad de 1.0, y en caso de ser menor , este se da como negativo, por lo que el equipo no detecta a un 100% (Ver tabla 2).

Por tanto, no es posible afirmar que se pueden detectar todos los microorganismos a una misma densidad bacteriana, porque a mayor densidad bacteriana menor es el volumen (0.5 ml) que se puede utilizar para evidenciar bacteremia, pero en caso de que esta sea baja, se podrían tener falsos negativos y por tanto no se haría evidente una bacteremia; es decir, que al utilizar volúmenes pequeños a 0.5 ml se disminuye la probabilidad de recuperación del microorganismo y se eleva el porcentaje de hemocultivos falsos negativos, aunque si se aumenta el volumen de muestra en el caso de neonatos, se puede poner en riesgo al paciente.^{17,32}

BACTERIA	SISTEMA	DILUCIONES							
		1:100		1:1000		1:10000		1:100000	
		0.5 ml (625 UFC/ml)	0.25 ml (312 UFC/ml)	0.5 ml (62.5 UFC/ml)	0.25 ml (31 UFC/ml)	0.5 ml (6.2 UFC/ml)	0.25 ml (3.1 UFC/ml)	0.5 ml (0.6 UFC/ml)	0.25 ml (0.3 UFC/ml)
<i>Escherichia coli</i>	Sangre	+	+	+	+	+	+	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	+	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sangre	+	+	+	+	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangre	+	+	+	-	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	-	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Brucella abortus</i>	Sangre	+	+	+	-	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	-	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	Sangre	+	+	+	-	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	-	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	Sangre	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Amikacina	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cefotaxima	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla No. 1 UFC/ml que detecta el sistema BACT/ALERT en base a volumen. Donde : (+) DESARROLLO, (-) NO DESARROLLO, (ND) NO DETERMINADO.

70

BACTERIA	SISTEMA	DILUCIONES							
		1:100		1:1000		1:10000		1:100000	
		0.5 ml	0.25 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.5 ml	0.25 ml
<i>Escherichia coli</i>	Sangre	+	+	+	+	+	+	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	+	+	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sangre	+	+	+	+	+	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	+	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangre	+	+	+	+	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bruceella abortus</i>	Sangre	+	+	+	+	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	Sangre	+	+	+	+	-	-	-	-
	Amikacina	+	+	+	+	-	-	-	-
	Cefotaxima	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	Sangre	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Amikacina	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cefotaxima	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND

TABLA 2.- Subcultivos terminales realizados a los hemocultivos retirados del sistema BACT/ALERT después de siete días.

10.0 DISCUSION

El hemocultivo es un medio adecuado al cual se han adaptado perfectamente las bacterias, estas se encuentran en un estado equilibrado³³. La división es por fisión binaria obteniéndose un crecimiento exponencial^{22,38}.

Existen diferentes técnicas para conocer el crecimiento bacteriano como son: utilizar diluciones y contar en placa, determinar el peso de las células, medición de la turbidez, formación de ácidos o bien medir ciertos procesos metabólicos como lo es la respiración.³⁸

En el caso del sistema BACT/ALERT se examina la producción de CO₂ y se mide cada 10 minutos, los puntos obtenidos en cada medición son graficados como unidades de reflectancia contra tiempo obteniéndose así una curva de crecimiento. Dichas mediciones se basan en el análisis de cambio en la concentración de CO₂ dentro de la botella. Esta concentración de CO₂ es comparada con el valor inicial de la botella, por lo que una diferencia entre el voltaje medido es determinado por el equipo como una generación de voltaje proporcional a la concentración de CO₂ en el medio de cultivo, dichos cambios en el voltaje total oscila entre 0.73 y 6.25 volts para que el equipo determine que hay crecimiento y por tanto se de un hemocultivo como positivo y a este punto de cambio se le denomina tiempo de positividad (tiempo de crecimiento).³⁴

El crecimiento bacteriano está limitado normalmente por el agotamiento de nutrientes disponibles o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo.³³

El tiempo que tarde un microorganismo en dividirse depende de la generación de microorganismos por tiempo el cual varía de acuerdo a la especie, donde la mayoría de las bacterias están en más o menos una hora.³⁸

La generación por tiempo varía con la especie del microorganismo, la concentración de los nutrientes en el medio, y temperatura de incubación. Otras condiciones como pH y oxígeno necesario para los aerobios, pueden influenciar en el desarrollo. Algunas especies se multiplican bajo condiciones favorables.³⁶

TIEMPO DE DETECCIÓN.

El tiempo de detección como se ha mencionado es de vital importancia para un hemocultivo, pero existen factores que lo pueden afectar como lo es el factor de dilución, inóculo, atmósfera, volumen y terapia establecida. Sin embargo, esto dependerá de manera primordial del tipo de microorganismo que se trate, de acuerdo a su metabolismo, así como del número de microorganismos viables existentes en el medio.

Volumen.

Como ya se ha mencionado la importancia de la sepsis en pacientes pediátricos, el laboratorio bacteriológico clínico busca nuevas técnicas que se puedan utilizar para realizar una rápida detección del agente causal. Por lo que en el presente estudio se busco probar la nueva botella FAN (factor neutralizante de antibiótico)del sistema BACT/ALERT, cuyos nuevos componentes (carbón activado, tierra de Fuller's, ecosorb) a diferencia de las botellas ya existentes y de acuerdo a su acción sobre las sustancias que interfieren en el crecimiento de los microorganismos, ofrecen ser más eficientes para la recuperación del agente causal. Pero hay que mencionar que existen diferentes factores que pueden afectar la detección del mismo, entre estos se encuentra el volumen de la muestra, presencia de agentes antimicrobianos, composición basal del medio, atmósfera, etc.

Para llevar a cabo el estudio se eligieron 6 cepas en base a la frecuencia de aislamiento como agentes causales de sepsis.

El volumen es un factor importante y de gran problema para ser establecido en pediatría, debido a que no existían hemocultivos pediátricos, fue hasta hace poco que las empresas manufacturaron botellas con un volumen de medio de cultivo menor al utilizado en botellas para adultos, hasta la fecha de realización del trabajo y de acuerdo a la bibliografía, la importancia del volumen radica en que el número de microorganismos presentes en sangre de niños es mayor en comparación con el de adultos, por lo que un incremento en el volumen de sangre a cultivar incrementa la probabilidad de recuperación de los mismos²³. Este incremento de acuerdo con lo reportado en estudios anteriores incrementa la probabilidad de 0.46 a 4.7% por cada mililitro de sangre.^{23,30}

Sin embargo, debido a la correlación entre el nivel de bacteremia y severidad de la enfermedad en niños, el volumen óptimo no ha sido aún definido. Por lo que el volumen razonable es de 1-2 ml en neonatos, 2-3 ml en infantes (1 mes- 2 años), 3-5 ml en niños y de 10-20 ml en adolescentes⁴¹.

Tomando en cuenta lo anterior el presente estudio se baso en la determinación de un volumen como valor de corte para evidenciar bacteremia o sepsis utilizando volúmenes pequeños de 0.25 ml hasta 2.0 ml, esto al hacer uso de la botella FAN para adulto, debido a que la pediátrica aún no llegaba al país.

Se probaron tres grupos de microorganismos: anaerobios facultativos (*E.coli*, *S.aureus*), aerobios (*P.aeruginosa*, *B.abortus*, y *C.albicans*), anaerobio (*C.perfringens*). Para los cuales se probaron volúmenes de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mililitros. Los resultados obtenidos indicaron que los tiempos de detección entre los diferentes volúmenes y tratamientos para cada especie fueron similares por lo que la diferencia entre ellos es no significativa, haciendo de esta manera evidente que se pueden utilizar volúmenes pequeños para evidenciar este tipo de procesos infecciosos, aunque no se puede afirmar que se puedan detectar todos los microorganismos a una misma densidad bacteriana, ya que la relación entre el volumen y la densidad bacteriana es inversamente proporcional. En caso de que

la densidad se a baja se podrían tener falsos negativos, es decir, que al utilizar volúmenes más pequeños a 0.5 ml se disminuye la probabilidad de recuperación del agente causal. En pacientes neonatos no se puede aumentar el volumen de sangre a cultivar porque se pone en riesgo su vida. Otro inconveniente que se tiene al utilizar volúmenes pequeños es que los microorganismos deben estar viables.

Para poder decir que se pueden utilizar volúmenes pequeños y obtener resultados positivos en hemocultivos, se tiene que contar con un equipo con suficiente sensibilidad de detección, por lo que al obtener resultados de hemocultivos negativos por el equipo y positivos en subcultivos terminales , se decidió comprobar la sensibilidad de el equipo, esto se comprobó al realizar diluciones partiendo de un 0.5 de McFarland , para llegar a inocular un volumen de sangre que tuviera diferentes UFC/ml hasta tener 0.03 UFC/ml y utilizando volúmenes de 0.5ml y 0.25ml, ya que el equipo esta diseñado para detectar de 1-3 UFC/ml. Respaldo esto por estudios anteriores en los que se detectaban hasta 4 UFC/ml en caso de *E.coli*, recuperándose un porcentaje elevado de hemocultivos positivos.

Al comparar los resultados obtenidos con los ya mencionados se logra apreciar que hay detección de *E.coli* en cantidades de 6 UFC/ml , pero esto sólo cuando se utilizan volúmenes de 0.5 ml de sangre y de aprox. 3 UFC/ml en volúmenes de 0.25 ml de sangre , aunque esto no es confiable , ya que se pueden tener falsos negativos. Sin embargo, este no es el caso de los otros microorganismos en estudio, ya que las UFC/ml mínimas para su detección fueron de 62 UFC/ml en muestras de 0.5 ml aún habiendo antibióticos presentes, además de que disminuye el porcentaje de hemocultivos positivos.^{11,17,32} (Ver tabla 1 y 2).

Atmósfera.

Para que un microorganismo pueda llevar a cabo su metabolismo, requiere de la respiración para la generación de energía, está depende de las condiciones atmosféricas en las que se encuentra el microorganismo en cuestión.

Sin embargo el microorganismo para su desarrollo puede o no utilizar el ciclo de Krebs y una cadena transportadora de electrones, siendo ambos casos designados como respiración aerobia y fermentación respectivamente. Ambos casos utilizan aceptores finales de electrones y generan ATP en diferente cantidad, siendo esto último, importante para el crecimiento del microorganismo.^{22,33}

Los aceptores de electrones pueden ser; en caso de respiración aerobia (aerobios estrictos) solo es el oxígeno. Mientras que en la anaerobia son el nitrato, sulfato y carbonato, dando cada uno, productos diferentes como resultado de su utilización.

En el caso de la fermentación, el aceptor es una molécula orgánica, dando como productos ácido láctico y etanol.^{22,33}

El tipo de atmósfera presente en el espacio de la botella es el primer factor que determina a la botella como aerobia o anaerobia, donde las botellas pueden ser usadas para recuperar microorganismos facultativos, aerobios o anaerobios.

Las botellas aerobias contienen una atmósfera mixta de CO_2 + Aire y la anaerobia N_2 + CO_2 , sin embargo, para favorecer la recuperación de los m.o. aerobios estrictos, se requiere de la ventilación de las botellas para aumentar la concentración de oxígeno. En particular para la recuperación de *Pseudomonas*

aeruginosa y levaduras, debido a que requieren de un nivel de oxígeno más elevado que el existente en la botella.^{22,37,41}

La recuperación de las bacterias anaerobias se incrementa siempre y cuando se conserve la atmósfera, porque una mala inoculación de la muestra a la botella (inyección de burbujas) causa una cierta aereación, lo que implica una disminución en la probabilidad de recuperación del m.o..^{33,37}

De acuerdo a los resultados en el caso de los facultativos estos se desarrollaron en ambas condiciones atmosféricas, hecho comprobado en el comportamiento similar mostrado por el microorganismo en ambos medios, aún cuando había antibiótico presente. Esto indica que el microorganismo puede utilizar tanto la respiración aerobia como la fermentación para la utilización de los nutrientes y así generar el ATP suficiente que empleara en su crecimiento.

Los aerobios hacen evidente que requieren de oxígeno para llevar a cabo sus funciones vitales, esto lo demuestran gráficamente la *P.aeruginosa*, *C. albicans*, y *B.abortus*. Aunque los tiempos de detección disminuyen cuando hay suficiente oxígeno en el medio, es decir, que este es una limitante para evidenciar el crecimiento de estos, debido a que se requiere del aumento de la concentración de este radical en el medio mediante la aereación del frasco, de esta manera se obtendrán resultados satisfactorios.

El CO₂ que se produce en cada uno de los procesos metabólicos, es liberado a la atmósfera en forma de gas. Este CO₂ es el que tiene que solubilizarse para que atraviese la membrana selectiva e interactúe con el agua del sensor. Se puede dar el vire del mismo al disminuir el pH. Sin embargo, no solo de esta manera puede disminuir el pH del medio, ya que de acuerdo a estudios anteriores, algunos ácidos entre 8-13 carbonos (hidrofóbicos), estando en su forma no

ionizada y su elevado peso molecular, puede cambiar el sensor al disminuir el pH, pero este cambio no es suficiente para que una botella se dé como positiva.¹²

Los productos ácidos finales provenientes del metabolismo (fórmico, acético, propiónico, butírico, valérico) podrían actuar disparando directamente la positividad de la respuesta o podrían interactuar indirectamente para incrementar la solubilidad del CO₂ y por tanto incrementar las unidades de reflectancia captadas por el equipo.¹²

Dilución:

Las botellas de hemocultivos contienen un volumen fijo de medio de cultivo dentro del cual irá un volumen finito de sangre, esto con el fin de que las propiedades naturales del suero sufran un efecto de dilución, y así el microorganismo no se vea afectado y por tanto se desarrolle para su posterior identificación.

Sin embargo esta dilución debe ser de acuerdo a la literatura de 1:5 o de 1:10 v/v, ya que diluciones menores a 1:5 disminuyen la recuperación del microorganismo por no inactivarse los sistemas naturales y diluciones mayores a 1:10 disminuyen la probabilidad de recuperación al entablarse una relación medio de cultivo-volumen de sangre muy grande, donde la recuperación del microorganismo podría ser nula..

En este estudio se probó el efecto dilución en las botellas FAN, ya que están diseñadas para adultos y los volúmenes de sangre empleados son pequeños (0.25 ml, 0.5 ml, 1.0 ml, 1.5 ml, y 2.0 ml), de tal manera que las diluciones empleados fueron de 1:160, 1:80, 1:40, 1:30, y 1:20 respectivamente, pero esto no fue un factor determinante que afectará el crecimiento del microorganismo, e influyera en el tiempo de detección debido a que se obtuvieron resultados

satisfactorios en la detección del crecimiento bacteriano, por tanto se pueden utilizar estas diluciones siempre y cuando haya microorganismos viables presentes en el medio de cultivo.

Comparación entre botellas FAN y botellas PEDI-BACT.

Como Ya se menciona anteriormente las primeras botellas de hemocultivo requerían de un volumen grande de muestra, por lo que al adaptarlas a casos pediátricos, se obtenían hemocultivos falsos negativos o bien la bacteremia pasaba desapercibida. Para solucionar esto el sistema BACT/ALERT introdujo la botella pediátrica PEDI – BACT. Sin embargo, en últimos tiempos ha tratado de mejorar sus botellas para obtener mejores resultados de una prueba tan importante como es el hemocultivo, esto considerando los factores que pueden afectarlo como lo son los antibióticos, para ello ha creado una nueva botella llamada FAN (factor neutralizante de antibiótico), la cual dentro de sus componentes cuenta con carbón activado, tierra de Fuller's, ecosorb para la neutralización.¹⁹

Para comprobar dicha acción y eficacia se hizo una comparación entre la botella FAN y la PEDI-BACT en iguales condiciones, empleando a 0.5 ml de sangre como volumen mínimo de corte, para detectar bacteremia o sepsis según sea el caso. Los tiempos de detección entre los diferentes microorganismos nos darán la respuesta.^{13,19}

El efecto dilución entre las botellas no fue ningún impedimento para que el microorganismo se desarrollara en el medio, ya que se presento la comparación del efecto dilución entre ellas, siendo de 1:40 para PEDI-BACT y de 1:80 para FAN. Sin embargo, está última con todo y dilución logró prácticamente igualar los resultados en cuanto a tiempo de detección de la botella pediátrica, mostrando así que es una buena opción para la recuperación de todo tipo de microorganismos incluyendo los fastidiosos. Además mostró la acción de sus componentes

especiales (carbón activado, tierra de fuller's, ecosorb) como una ayuda en la neutralización de otras estructuras moleculares como lo son los antibióticos.

La recuperación de las bacterias anaerobias se incrementa siempre y cuando se conserve la atmósfera, porque una mala inoculación de la muestra a la botella (inyección de burbujas) causa una cierta aereación, lo que implica una disminución en la probabilidad de recuperación del m.o.. Un hemocultivo adecuado tiene un tiempo de incubación para ser recuperado es corto (aprox. 5 días) al ser monitoreado.^{33,37}

La frecuencia de bacteremias por anaerobios es baja, lo que algunos sugieren el reemplazar una segunda botella y utilizar solo una para disminuir los costos.²³

Sin embargo, hay quienes hablan de utilizar un volumen menor en el caso de los neonatos, pero esto, no se ha definido totalmente al hacer uso de las botellas FAN, pertenecientes al sistema BACT/ALERT, las cuales, cuentan con un volumen de 40 ml de medio, lo que es un factor que puede afectar la detección del hemocultivo positivo, que al utilizar volúmenes más pequeños de sangre, la relación medio de cultivo – muestra se altere de acuerdo a lo reportado en literatura, donde lo ideal es 1:10 para la obtención de buenos resultados.^{13,19}

11.0 CONCLUSIONES

- La carga bacteriana es de vital importancia para que un hemocultivo sea positivo. El volumen mínimo para evidenciar desarrollo fue de 0.5 ml de sangre, ya que volúmenes menores pueden dar falsos negativos.
- Para que un hemocultivo sea detectado como positivo por el equipo se requirió de un inóculo mínimo de 4 UFC/ml en el caso de Enterobacterias, no siendo el mismo para otros m.o. fastidiosos, donde el inóculo mínimo fue de 62.5 UFC/ml.
- La dilución es un factor que influye en la positividad del hemocultivo, y de acuerdo a la literatura la adecuada es 1:10. En el presente estudio la utilizada fue mayor a 1:40, de acuerdo al volumen de la botella, sin repercusión en la obtención de resultados satisfactorios.
- La importancia de la aereación del hemocultivo se puso de manifiesto en el caso de m.o aerobios estrictos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bruceella abortus*.
- En el sistema en estudio se requiere de la producción de CO₂ por parte del microorganismo para evidenciar su crecimiento, por lo que son importantes las condiciones nutricionales, así como las atmosféricas.
- Las curvas de crecimiento de cada microorganismo en estudio fueron diferentes y características entre sí, lo que hace notar, que cada grupo requiere de condiciones distintas.
- El tiempo de detección dependerá de la producción de CO₂, generado por el metabolismo de la bacteria. Observando una relación inversamente proporcional entre el inóculo y el tiempo de detección.

- La presencia de Ecosorb no interfiere con la capacidad de las botellas FAN para recobrar y detectar m.o . Además el tiempo de detección al comparar la botella FAN con la PEDI-BACT fue similar.
- Ambas botellas dan resultados similares en cuanto al tiempo de recuperación del microorganismo.
- El factor dilución no fue obstáculo para el desarrollo adecuado del microorganismo.
- Se demostró la neutralización de antibióticos en la botella FAN al observar tiempos similares tanto en presencia como en ausencia del antibiótico.
- Estudios preliminares indican que el ecosorb es capaz de remover otros factores potencialmente inhibitorios, incluyendo complemento, lisozima, transferrina, fracción gama globulina, peróxido y caramelización en el autoclaveado.
- De acuerdo a los componentes neutralizadores de antibióticos de la botella FAN, esta ofreció una recuperación de microorganismos, aunque ya exista terapia establecida, siempre y cuando los microorganismos estén viables.

APENDICE A

COMPONENTES

Cuadro No. 5- a) Métodos manuales:

Sistema	medio	dilución	anticoagulante % sps	Vol. de medio (ml)
Ruiz-Castañeda	TSB, BHI, Suplemento de peptona, A. Columbia, A. Brucella, tiol, y tioglicolato	1:5	0.025 - 0.050	50-100
Septi-Chek	Paddle (A.MC, A.Ch, A.Maltosa)	1:5	0.025	20
Isolator	Saponina, fluorocarbon, polipropilenglicol.	-	EDTA	-

Cuadro No. 6 : b) Sistemas automatizados

BACTEC

Sistema / botella	Medio	Vol. de medio (ml)	Dilución Vol.-medio	Anticoag. % SPS	Atmósfera
Radiométrico					
6B	SCDSCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + aire
7D	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + N ₂
8B	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + aire
13*	MB7H13	30	1:6	0.025	CO ₂ +aire
16B	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + aire
17D	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + N ₂
No Radiométrico					
6A	SCD	30	1:6	0.035	CO ₂ + aire
7A	SCD	30	1:6	0.035	CO ₂ + N ₂
8A	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + aire
16A	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + aire
17A	SCD	30	1:6	0.025	CO ₂ + N ₂
PLUS 26	SCD	25	1:2.5	0.050	CO ₂ +aire
PLUS 27	SCD	25	1:2.5	0.050	CO ₂ + N ₂
PEDS PLUS	SCD	20	1:6	0.025	CO ₂ +aire
HBV - FM	BHI/SCD	25	1:2.5	0.050	CO ₂ + aire
LITICO	SCD	30	1:6	0.035	CO ₂ + N ₂

SCD: Digerido de Soya - Caseína
Además contiene resinas

Cuadro No 7: c) Sistemas de monitoreo continuo (CMBCS)

SITEMA/BOTELLA A	MEDIO DE CULTIVO	VOL. MEDIO (ml)	DILUCION	ATMOSFERA	VENTILACION REQUERIDA	ANTICOAG. % SPS
BACTEC						
aerobia std/F	SCD	40	1:8	CO ₂ + aire	NO	0.025
anaerobia std/F	SCD	40	1:8	CO ₂ + N ₂	NO	0.025
Plus aerobia/F	SCD	25	1:2.5	CO ₂ + aire	NO	0.050
Plus anaerobia/ F	SCD	25	1:2.5	CO ₂ + N ₂	NO	0.050
ESP						
80A	SCP	80	1:8	CO ₂	NO	0.006
80N	PP	80	1:8	CO ₂ + N ₂	NO	0.070
EZDRAW 40A	SCD	40	1:8	CO ₂	NO	0.006
EDDRAW 40 N	PP	40	1:8	CO ₂ + N ₂	NO	0.070
VITAL						
aerobia	SCD	40	1:4	CO ₂ + O ₂	NO	0.025
anaerobia	SCD	40	1:4	CO ₂ + N ₂	NO	0.025
BACT/ALERT						
aerobia	SCD	40	1:4	CO ₂ + aire	SI	0.035
anaerobia	SCD	40	1:4	CO ₂ + N ₂	NO	0.035
Pedi -Bact	BHI	20	1:::5	CO ₂ + N ₂	SI	0.020
FAN aerobia	BHI	40	1:4	CO ₂ + aire	SI	0.050
FAN anaerobia	BHI	40	1:4	CO ₂ + N ₂	NO	0.050

12.0 BIBLIOGRAFIA

1. . Auckenthaler.R , Rohner P. , et all. (1993) Continuous monitoring blood culture systems. Pp 463-468.
2. . Bailey Scott.(1983) Diagnóstico microbiológico. Editorial Medica Panamericana. México. pp 49-70.
3. . Bone Roger C. (1991) Let's agree on terminology: definitions of sepsis. Critical Care Medicine.19(7):973-976.
4. . Borobio V.M. Perea J.E.(1994) Septicemia. Editado por antibióticos. .
5. . Courcol R.J.,Fruchart A.I. (1986). Routine evaluation of the nonradiometric BACTEC NR 660system . Journal of Clinical Microbiology.14 (1):26-29.
6. . Courcol R.J., Duhamel M. (1992). BioArgos : a fully automated blood culture system . Journal of Clinical Microbiology .30(8):1995-1998.
7. . Fernández Canton Sonia, et all.(1996). Anuario Estadístico . Secretaria de salud, Subsecretaria de prevención y de enfermedad. Dirección Gral. de estadística e informática. pp. 165,172,179,190,209,211,240.
8. .Ferro R.A.,Gallegos.C.E. (1998).Recopilación bibliográfica de antibióticos beta-lactámicos como tratamiento de última elección en cepas multiresistentes de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para obtener título de licenciatura (FESC-UNAM).
9. . González S.N. , Saltigeral S.P., (1997) . Guía de antimicrobianos C, antivirales , antiparasitarios , y antimicóticos . 4ª. Edición . McGraw· Hill Interamericana. México. pp.24 - 32 , 77 - 84 .

- 10..- Goodman and Gilman's . (1996). The Farmacological Basis of Terapeutics . 9ª. Edición . International edition . pp. 1029 – 1056 .
- 11..- Isaacman D.J.,Karasic R.B. (1996). Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children . The journal of pediatrics .128(2):190-194
- 12..- Jeffrey S. Thorpe T. (1996). Detection of metabolites other than CO₂ by Bact/Alert . Annual Meeting Of The American Society For Microbiology . pp 31-37.
- 13..- Krisher K.,Whyburn D.R. (1993). Comparison of the Bact/Alert pediatric blood culture system , Pedi-Bact , with conventional culture using the 20 milliliter Becton – Dickinson supplemented peptone broth tube . J.Clin.Microbiol.. 31(4):793-797.
- 14..-Leibovici Leonard, Drucker Moshe, et all.(1997) .Septic shock in Bacteremia patients: Risk factors, Features and prognosis". Scand J. Infect Dis. pp 71-75.
- 15..- Litter Manuel. (1986). Compendio de farmacología . 3ª edición. Editorial TENEO . Buenos Aires . pp 596-602.
- 16..- Matra.J.Y., Greenberg D., (1998). Positive blood cultures for coagulasa negative Staphylococci in neonatos : does highly selective vancomycin usage affect out come ? . Infection . 26(2):85-92.
- 17..- Mermel LA y Maki D.G. (1993). Detection of bacteremia in adults : consequences of culturing an inadequate volume of blood . Ann Intern Med. 1(119):270-272.

- 18..· Mitra S., Panigrahi D. (1997). Anaerobes in neonatal septicaemia : a cause for concerní . *J.Trop.Pediatric* . 43(3):153-155.
- 19..· Pickett. D.A., Welch D.F. (1995). Evaluation of the automated Bact/Alert system for pediatric blood culturing . *Am J. Clin Pathol* .103(3):320-323.
- 20..· Piédrola G.Gil., et all.(1994) " Medicina Preventiva y Salud Pública". 9ª. Edición. Editorial Masson – Salvat Medicina. pp 695 – 705.
- 21..·Ponce De León Samuel, Rivera M. Irma , et all.(1993). Factores de riesgo en bacteremias primarias: un estudio de casos y controles . Departamento de Infectología. INN. pp 368· 372.
- 22..· Prescott L.M. , Hrley .J P. (1999). Microbiología . McGraww –Hill company . España . pp 114 – 119.
- 23..· Reimer L.G, Wiloon M.L. (1997).Update on detection of bacteremia and fungemia . *Clinical Microbiology Reviews* .10(3):444-465.
- 24..· Remo M. B. (1993) . Antibióticos . 5a edición . Editorial medica panamericana . Buenos Aires . Capítulos 1,2,3 .
- 25..· Roberts M. et all.(1993) Sepsis . *Infectious Disease Journal* . 2(2):53-57.
- 26..· Ruíz Castañeda (1947). A practical method for rutine blood cultures in Brucellosis. *Pro.Exp.Biol. and Med.* 64:114-115.
- 27..· Saez Lloren S. and McCracken E. (1993). Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology and management. *The journal of Pediatrics*.123(4):497-508
- 28..· Salgers A. A., W.D.Dixice . (1994) . Bacterial pathogenesis. A molecular approach . ASA PRESS. Washington . Cap. 8

- 29.. Sawhney D, Hinder S, Swiane D, et al. (1986) Novel method for detecting micro-organisms in blood cultures. *Journal Clinical Pathology*. 39:1259-1263.
- 30.. Schelonka R.L., Chai M.K. (1996). Volume of blood required to detect common neonatal pathogens . *The journal of Pediatrics* .129(2):275-278.
- 31.. Smith .G. et all .(1993) Sepsis y choque séptico. *Infectología Pediátrica* . pp. 157-180.
- 32.. Solórzano S.F., Miranda N.M., (1998). A blood micro-culture system for diagnosis of bacteremia in pediatric patients . *Scand Journal Inf Dis* .30(5):481-483 .
- 33.. Stanier R.Y., (1986) . *Microbiología* , 4a edición. Ediciones REPLA . México . Cap.9
- 34.. Thorpe T.C. .(1990). Bact/Alert : an Automated colorimetric microbial detection system .*Journal of Clinical Microbiology* .28(7):1608-1612
- 35.. Thuler S.C.L., Jenicek .M, et all.(1997) Impact of a false positive blood culture result on the management of febrile children. *Journal the pediatric infectious disease*.16(9):846-851.
- 36.. Torrabadella de Reynoso P.(1992) *Medicina Interna. Bacteremia y shok septico*. pp. 2283-2288.
- 37.. Tortora J. (1992).*Microbiology an introduction* . 4a. edition . Benjamin Cummings Publishing Company. pp 109-122.
- 38.. Volk W.A. , Wheeler M.F. , (1980). *Basic Microbiology* . 4a edición . Lippincott company . USA. pp 68-76.

- 39.. Walker T.S.(1999). Microbiología. McGraw – Hill Interamericana. México.
pp 2-7.
- 40.. Washignton J.A. (1986) . II and Iltrup D.M. “ Blood cultures : Issues and
controversies. Reviews of infectious diseases. 8(5):792-802.
- 41.. Wilson L. Michael.(1994) . Clinics in Laboratory Medicine , blood cultures.
1ª. Edición. Editorial Saunders Company. 14(1):17-30,133-170.
- 42.. Zaidi A.K.,Mirret S.(1997).Controlled comparison of bioMerieux VITAL
and BACTEC NR-660 systems for detection of bacteremia and fungemia in
pediatric patients. J.Clinics Microbiologic . 35(8):2007-2012.