



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE BACTEREMIAS EN EL
HOSPITAL ESPAÑOL EMPLEANDO EL SISTEMA BACTEC
(9120 DE LA SERIE FLUORESCENTE)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

PATRICIA ARMENTA BÁRCENAS

DIRECTOR DE TESIS: M en C ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. LILIA TEQUIANES BRAVO

MÉXICO, D.F.

2008

INTEGRANTES DEL JURADO

**PRESIDENTE MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ
VOCAL M.en C ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ
SECRETARIO Q.F.B. LILIA TEQUIANES BRAVO
SUPLENTE Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO
SUPLENTE Q.F.B. GABRIEL ALEJANDRO ROMERO DÍAZ**



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.

A MIS HIJOS

CÉSAR Y GABY
POR SER LAS PERSONAS QUE MÁS
QUIERO EN LA VIDA

TÚ ERES LA MAYOR RIQUEZA PARA TÍ
MISMO Y ESA RIQUEZA NADIE PUEDE
QUITÁRTELA. PORQUE TÚ NO ERES LO
QUE TIENES , SI NO LO QUE ERES.

RENÉ JUAN TROSSERO

Mi AGRADECIMIENTO AL PERSONAL DEL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL ESPAÑOL

Q.F.B. EVA NETERAS VELDES

Q.F.B. CARLOS MARTÍN VILLALPANDO ROMO

Q.F.B. JULIO JESÚS ALFARO LÓPEZ

Q.F.B. OFELIA ALMA PÉREZ RESENDIZ

Q.F.B. GUADALUPE RINCÓN MENDEZ

A MIS PADRES LUCIO Y DOLORES POR
DARME LA VIDA Y SIEMPRE ESTAR
CONMIGO.

ESPECIALMENTE CON MUCHO
RESPETO
M.en C. ÁNGEL GARCÍA POR SU
LEALTAD, TOLERANCIA, CONFIANZA Y
APOYO.

A LA Q.F.B. LILIA TEQUIANES POR SU AYUDA PARA
REALIZAR ESTE TRABAJO Y SU GRAN
DISPOSICIÓN EN TODO MOMENTO.

MTRA. DORA ALICIA GRACIAS POR RECORDARME
QUE VALE LA PENA SER HONESTO SOBRE TODO
CON UNO MISMO, QUE TARDE O TEMPRANO
OBTENEMOS NUESTRA RECOMPENSA PRODUCTO
DE NUESTRO TRABAJO Y ESFUERZO.

A LOS Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZALÉZ Y GABRIEL
ALEJADRO ROMERO POR SU TIEMPO DEDICADO A
ESTE TRABAJO.

MARY GRACIAS POR MOSTRARME UN DESTELLO
DE LUZ CUANDO TODO ERA OSCURIDAD.

CARLOS Y EVA GRACIAS POR TENER SIEMPRE UN
MOMENTO PARA ESCUCHARME Y DECIRME UNA
PALABRA DE ALIENTO.

CLAUDIA Y ROCIO, AGRADEZCO Y APRECIO SU
APOYO Y AMISTAD SE QUE SIEMPRE ESTARAN
CONMIGO.

ÍNDICE

1. Resumen	1		
2. Introducccón	3		
3. Marco teórico	5		
3.1. Antecedentes históricos	5		
3.2. Bacteremia	6		
3.2.1. Clasificación de bacteremias	6		
3.2.2. Factores de riesgo más comunes que pueden inducir a la bacteremia	8		
3.2.3. Alteraciones más frecuentes en pacientes con bacteremia en otros estudios de laboratorio	10		
3.2.4. Criterios para diagnosticar una bacteremia verdadera	10		
3.3. Etiología de las bacteremias	15		
3.4. Patogenia de los principales agentes causales de bacteremias	17		
3.4.1. Estafilococos	17		
3.4.2. Estreptococos	19		
3.4.3. Enterobacterias	20		
3.4.4. Bacterias no fermentadoras de lactosa	21		
3.4.5. Acteroides	23		
3.5. Manifestaciones clínicas de las principales bacteremias	25		
3.5.1. Bacteremia gramnegativa	25		
3.5.2. Bacteremia estafilocócica	26		
3.5.3. Bacteremia gonocócica	27		
3.5.4. Bacteremia meningocócica	28		
3.5.5. Bacteremia debida a bacteroides	29		
		3.5.6. Bacteremia por clostridios	29
		3.5.7. Bacteremia de etiologías diversas	30
		3.6. Catéteres	31
		3.6.1. Bacteremias relacionadas al uso de catéteres	31
		3.6.2. Factores de riesgo de implementos intravasculares	32
		3.6.3. Recolección y transporte de las muestras de catéteres	34
		3.6.4. Métodos de diagnóstico de infecciones causadas por catéteres	35
		3.7. Evidencias epidemiológicas y frecuencias	38
		3.8. Generalidades del hemocultivo	39
		3.8.1. Recomendaciones al extraer una muestra de sangre	40
		3.8.2. Medidas de seguridad al tomar un hemocultivo	40
		3.8.3. Etiquetado de las botellas de hemocultivo	41
		3.8.4. Transporte de las muestras	41
		3.8.5. Momento en que debe tomarse un hemocultivo	42
		3.8.6. Volumen y factor de dilución requeridos	43
		3.8.7. Número de hemocultivos recomendados en diferentes casos	44
		3.8.8. Tiempo y temperatura de incubación	46
		3.9. Métodos de hemocultivo	47
		3.9.1. Diferentes métodos de diagnóstico de bacteremias	47
		3.9.2. Métodos convencionales	48
		3.9.2.1. Método convencional líquido	48
		3.9.2.2. Método convencional bifásico	51
		3.9.3. Métodos no convencionales, no automatizados	52
		3.9.3.1. Sistema de cultivo de sangre lisada y centrifugada	52

3.9.3.2.	Sistema de cultivo de sangre con subcultivo incluido	55	3.10.3.	Sistemas automatizados	84
3.9.3.3.	Detección de microorganismos por cambios en la impedancia eléctrica	57	3.10.3.1.	Sistema VITEK	84
3.9.3.4.	Otros métodos para la detección de bacteremias que no requieren cultivo	57	3.10.3.2.	Microscan Walkaway	85
3.9.4.	Métodos no convencionales automatizados	59	3.10.3.2.1.	El equipo Microscan conta de:	85
3.9.4.1.	Sistema de cultivo de sangre radiométrico	59	3.10.3.2.2.	Precauciones en el uso de paneles	85
3.9.4.2.	Sistema de cultivo de sangre infrarrojo	61	3.10.3.2.3.	Control de calidad de los paneles deshidratados Microscan	88
3.9.4.3.	Sistema de cultivo de sangre fluorométrico	64	3.10.3.2.4.	Sistema de inoculación Prompt D para el estudio de la sensibilidad por microdilucion	89
3.9.4.3.1.	Principales características del sistema BACTEC 9120	70	4.	Planteamiento del problema	92
3.9.4.3.2.	Calibración y control del instrumento BACTEC 9120	71	5.	Hipótesis	94
3.9.4.3.3.	Mantenimiento diario	72	6.	Objetivos	95
3.9.4.3.4.	Mantenimiento preventivo	73	7.	Material y métodos	96
3.9.4.3.5.	Características del medio de cultivo de sangre BACTEC serie fluorescente	73		Diagrama	115
3.9.4.3.6.	Componentes de las botellas de cultivo BACTEC serie fluorescente	76	8.	Diseño estadístico	116
3.9.4.3.7.	Tipos de botellas de hemocultivos BACTEC	77	9.	Resultados	117
3.9.4.3.8.	Control de calidad de las botellas de cultivo BACTEC	79	10.	Discusión	128
3.10.	Sistemas de identificación bacteriana	80	11.	Conclusiones	138
3.10.1.	Métodos manuales	81	12.	Referencias	140
3.10.1.1.	API 20	81	13.	Anexos	153
3.10.2.	Métodos semiautomatizados	82	14.	Abreviaturas	167
3.10.2.1.	El sistema Biolog GN Microplate	82	15.	Glosario	169
3.10.2.2.	Sistema Sceptor System Becton Dickison	83			

1. RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo para conocer los porcentajes de los microorganismos causantes de bacteremias en una institución de salud privada (Hospital Español) y establecer si existe alguna similitud con lo reportado por instituciones públicas de salud. Para ello se tomaron los resultados de los hemocultivos realizados en un lapso de 5 años que comprendió del año 2000 al 2004.

El porcentaje de hemocultivos positivos fue de 9.44% (1028 de 10885) con un claro predominio de microorganismos gramnegativos, seguido de los grampositivos y dónde destacó la presencia de fungemias con un 9.24% y aunque el objetivo era solamente evaluar los casos de bacteremias, los reportes incluían infecciones en sangre provocadas por levaduras en un porcentaje considerado como digno de tomarse en cuenta ya que además para este tipo de microorganismos no se encontraron datos relevantes que manifestaran problemas relacionados con los mismos.

Las bacteremias causadas por gramnegativos tuvieron un 46.78% y a su vez las causadas por grampositivos un 41.92%, concordando con lo establecido por algunos autores y difiriendo con lo encontrado por otros. La sección del hospital dónde se localizaron la mayoría de bacteremias fue la unidad de terapia intensiva, algo que pareciera lógico por la cantidad de procedimientos invasivos realizados en los pacientes que ahí permanecen, teniéndose de manera estadística que los

microorganismos encontrados dependen de la sección dónde son aislados.

Se concluyó que una de las causas de este tipo de problemas viene a ser la falta de cuidados por parte del personal médico y paramédico en el momento de realizar los procedimientos al paciente así como que los porcentajes encontrados en el presente estudio difieren con los de otros autores estableciendo que no existen diferencias en los valores reportados en relación al tipo de institución, pudiendo ser otras causas las que originen este tipo de infecciones y que se tengan o no en común en ambas instituciones de salud.

2. INTRODUCCIÓN

El ser humano, al igual que cualquier otro ser vivo es vulnerable a contraer una gran variedad de padecimientos en los que se ven involucrados diversos factores. Los problemas de salud provocados pueden ser de leves hasta graves y por causas diferentes, entre los principales cabe mencionar aquellos que son debidos a microorganismos.

La gran variedad existente de estos hace que la gama de enfermedades sea también muy amplia, ya que el o los agentes causales bien pueden ser bacterias, hongos, parásitos y partículas virales. En el caso de las bacterias, la cantidad de enfermedades producidas por las mismas es muy alta y en ocasiones pueden incluso ser de consecuencias irreversibles, esto es, que el tratamiento empleado para contrarrestar sus efectos no surta ya efecto poniendo en peligro la vida misma de las personas.

Uno de los principales sitios que puede ser invadido por bacterias es el torrente sanguíneo (bacteremia), ya sea por deficiencia inmunológica o por algún procedimiento invasivo realizado casi siempre a nivel hospitalario, lo cual puede tener efectos adversos llegando en situaciones extremas a la muerte del individuo. La frecuencia de las principales bacterias identificadas en estudios previos es alta y similar en los sitios dónde se han llevado a cabo, siendo prácticamente en todos los casos hospitales del sector salud (instituciones públicas), ignorando que es lo que sucede en una institución

privada. De lo anterior surge la interrogante por saber cuáles son los géneros y especies más frecuentemente identificados como agentes causales de bacteremia en un hospital privado y así poder deducir si el tipo de servicio que se da en una institución privada pudiera marcar alguna diferencia en cuanto a los géneros, especies y porcentajes encontrados de tales microorganismos o si la aparición de este tipo de infecciones tiene otros factores involucrados independientemente del tipo de atención que se da en ambos sitios o bien si los microorganismos encontrados tengan relación alguna con sitios específicos del hospital sin tener que ver el carácter de la misma.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los microorganismos existen en el planeta desde antes que existiera el ser humano, pudiéndole causar beneficios y enfermedades. No fue sino hasta el siglo XVI gracias a los descubrimientos de Antonio Van Leeuwenhoek que estos fueron observados por primera vez, teniendo que pasar siglos antes de que el hombre empezara a entender que esos diminutos seres eran los causantes de infecciones y enfermedades. Por más de un siglo, las infecciones nosocomiales se han considerado un problema crítico que afecta la calidad del cuidado de la salud. La mayor parte de las infecciones en aquel entonces eran causadas por estreptococos siendo hasta el cuarto decenio del siglo pasado que se hicieron más evidentes por la divulgación del uso de la penicilina. Alrededor de 1948 después de la euforia que despertó la aplicación exitosa de antibióticos en las infecciones piógenas, particularmente las causadas por *Staphylococcus aureus*, se presentaron los primeros casos de cocos resistentes al antibiótico. La generalización de los accidentes infecciosos en heridas quirúrgicas provocó el cierre de algunas instituciones y servicios quirúrgicos.^{1,2}

En los años cincuenta, el interés por las infecciones postoperatorias, producidas en su mayor parte por *Staphylococcus aureus*, se multiplicó a escala mundial, lo que inició la formación de comités de vigilancia tanto a nivel de institución como nacional. Alrededor de 1980 se detectó un

cambio en la frecuencia de cocos grampositivos por bacilos gramnegativos resistentes a diferentes antibióticos, por ejemplo; la *Escherichia coli* multirresistente que fue a su vez sustituida por *Pseudomonas aeruginosa* y por diferentes especies de *Enterobacter* y *Klebsiella*, con incursión ocasional de otros géneros de enterobacterias. Al final del decenio de los ochentas se incrementó el uso de procedimientos invasivos apareciendo en casi todos los hospitales del mundo infecciones por estafilococos coagulasa negativa (*S. Epidermidis* y *S. hemolyticus*), hasta entonces considerados comensales sin importancia médica, llegando a ser patógenos letales produciendo efectos nocivos para la salud en el ser humano incluso avanzar hasta la aparición de una bacteremia.³

3.2 BACTEREMIA

Es la presencia de bacterias en estado de multiplicación activa en el torrente sanguíneo, con liberación de productos tóxicos para el huésped y capacidad de producir infecciones en diversos órganos y sistemas.⁴

3.2.1 CLASIFICACIÓN DE BACTEREMIAS

Las bacteremias se clasifican intrahospitalariamente como primarias y secundarias:

- A) **Bacteremia primaria:** se define como la identificación de un microorganismo en un hemocultivo en pacientes hospitalizados o dentro de los primeros tres días

posteriores al egreso, con manifestaciones clínicas de infección y en quienes no es posible identificar una fuente infecciosa que explique los síntomas. Los principales sitios de infección primaria que generan la bacteremia son: vías urinarias, infección endovascular, infecciones de vías respiratorias bajas, infección intraabdominal, heridas quirúrgicas, infecciones de la piel y tejidos blandos.^{5,6}

B) **Bacteremia secundaria:** es la que se presenta con síntomas de infección localizada a cualquier nivel, con hemocultivo positivo. Se incluyen aquí candidemias y bacteremias secundarias a procedimientos invasivos tales como angiografía coronaria, colecistectomías, hemodiálisis, cistoscopías y colangiografías. En caso de contar con la identificación del microorganismo del sitio primario, debe ser el mismo que el encontrado en sangre. En pacientes que egresan con síntomas de infección hospitalaria y desarrollan bacteremia secundaria, ésta deberá considerarse nosocomial independientemente del tiempo del egreso.^{7,8}

Las bacteremias reflejan los mecanismos de ingreso de las bacterias al torrente sanguíneo pudiendo ser:

A) **Bacteremia transitoria:** puede producirse cuando los microorganismos, a menudo comprendidos en la flora normal, se introducen a la sangre. Se ha sugerido que la bacteremia transitoria es una condición cotidiana, que se produce casi siempre que el individuo cepilla

sus dientes de forma violenta o tiene un movimiento intestinal.⁸

B) **Bacteremia intermitente:** a menudo sobreviene cuando las bacterias de un sitio infectado son liberadas en forma espasmódica en la sangre. Estos sitios pueden ser abscesos extravasculares no drenados, cavidades empiémicas o infecciones difusas por ej. celulitis, peritonitis, artritis séptica.⁹

C) **Bacteremia continua:** habitualmente se presenta en casos en que los microorganismos tienen acceso directo al torrente sanguíneo, como endocarditis bacteriana, fístulas arteriovenosas infectadas, implante de catéteres intraarteriales, cánulas permanentes, en la etapa temprana de fiebre tifoidea, brucelosis y leptospirosis. La fuente de infección puede no estar determinada hasta en un tercio de las bacteremias.^{9,10}

3.2.2 FACTORES DE RIESGO MÁS COMUNES QUE PUEDEN INDUCIR A LA BACTEREMIA¹¹

- ✓ Edad (es más frecuente en pacientes prematuros, neonatos y geriátricos)
- ✓ Trastornos vasculares
- ✓ Uso de fármacos citotóxicos que causan granulocitopenia
- ✓ Pérdida de barreras cutáneas (quemaduras, úlceras, heridas)
- ✓ Alteraciones de la barrera microbiana (por uso de antimicrobianos, jabones, antisépticos, antiácidos)

que alteran el pH inhibiendo y cambiando la flora microbiana normal)

- ✓ Desequilibrio hormonal
- ✓ Inmunodeficiencias [insuficiencia renal, diabetes *mellitus*, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), lupus eritematoso sistémico (LES) etc.]
- ✓ Enfermedades malignas (pacientes oncológicos)
- ✓ Trastornos metabólicos
- ✓ Deficiencias nutricionales (desnutrición, obesidad)
- ✓ Uso de implementos invasivos como tubos endotraqueales, catéteres intravasculares, sondas intracraneales, drenajes de heridas quirúrgicas, sondas vesicales
- ✓ Uso de corticoides que alteran la inmunidad celular
- ✓ Pacientes con adicción a drogas (como heroína)

3.2.3 ALTERACIONES MÁS FRECUENTES EN PACIENTES CON BACTEREMIA EN OTROS ESTUDIOS DE LABORATORIO

Las alteraciones más características son incremento en la cuenta leucocitaria en cifras de 10,000 a 30,000/ μ L; puede haber plaquetopenia, alargamiento en los tiempos de coagulación y tardíamente trombocitosis. La gasometría arterial muestra al principio alcalosis respiratoria y en etapas tardías acidosis e hipoxemia. En el hígado se inicia la síntesis de "reactantes de fase aguda", que se traduce como incremento en la síntesis de fibrinógeno y proteína "C" reactiva. Hay aumento en la velocidad de eritrosedimentación e hipoalbuminemia, hipercalemia, hiperglicemia, hipofosfatemia, disminución de antitrombina III entre otras.¹²

3.2.4 CRITERIOS PARA DIAGNOSTICAR UNA BACTEREMIA VERDADERA

A) Un hemocultivo positivo para bacilos gramnegativos, *Staphylococcus aureus* u hongos es suficiente para diagnosticar una bacteremia verdadera. Ante el aislamiento de un bacilo grampositivo o estafilococo coagulasa negativa puede considerarse bacteremia si se cuenta con dos o más de los siguientes criterios:

- ✓ Alteraciones hemodinámicas
- ✓ Trastornos respiratorios

- ✓ Leucocitosis o leucopenia no inducida por fármacos
- ✓ Alteraciones en la hemostasia (incluyendo trombocitopenia)
- ✓ Aislamiento del mismo microorganismo en otro sitio anatómico

B) *Bacteremia no demostrada en adultos*: en pacientes con evidencia clínica de bacteremia pero en quienes no se aísla el microorganismo, ésta se define como pacientes con fiebre o hipotermia con dos o más de los siguientes criterios: ^{13,14}

- ✓ Calosfrío
- ✓ Taquicardia (> 90 latidos /minuto)
- ✓ Taquipnea (>20 latidos /minuto)
- ✓ Leucocitosis o leucopenia (> 12, 000 / μ L ó < 4, 000 / μ L y más de 10% de bandas)
- ✓ Respuesta al tratamiento antimicrobiano

C) *Bacteremia no demostrada en niños*: pacientes con fiebre, hipotermia o distermia con uno o más de los siguientes criterios:

- ✓ Taquipnea o apnea
- ✓ Calosfrío
- ✓ Taquicardia
- ✓ Ictericia

- ✓ Rechazo al alimento
- ✓ Hipoglucemia

Más cualquiera de los siguientes:

- ✓ Leucocitosis o leucopenia
- ✓ Relación bandas/ neutrófilos segmentados > 15%
- ✓ Plaquetopenia < 100, 000 μ L
- ✓ Respuesta al antimicrobiano

Bacteremia relacionada a líneas y terapia intravascular: hemocultivo positivos con dos o más de los siguientes criterios:

- ✓ Relación temporal entre la administración de terapia intravascular y la aparición de manifestaciones clínicas
- ✓ Ausencia de infección evidente
- ✓ Identificación de contaminación de catéter o solución endovenosa
- ✓ Desaparición de signos y síntomas al retirar el catéter o la solución sospechosa
- ✓ Cultivo de punta de catéter > 15 unidades formadoras de colonia (UFC) (técnica de rotación Maki) ó > 1000 UFC/mL (técnica de dilución Cleri) ¹⁵

En hemocultivos se llegan a aislar microorganismos que rara vez representan una infección verdadera como *Corynebacterium sp*, *Bacillus sp*, *Propionibacterium sp*, que solo en menos del 5% tienen significado clínico; *Staphylococcus coagulasa negativa* en el 15% y los *Streptococcus viridans* en el 38% de los casos. Por esto se tienen los siguientes criterios para poder interpretar los resultados:¹⁶

Criterio 1. Paciente menor de un año de edad con al menos uno de los siguientes signos y síntomas: fiebre (>38 °C), hipotermia (<37 °C), periodos de apnea, bradicardia y cuando menos uno de los siguientes:

- ✓ Flora contaminante de piel (difteroides, especie de *Bacillus*, especie de *Propionibacterium*, estafilococo coagulasa negativa, micrococcos) aislada en dos o más hemocultivos, tomados en ocasiones diferentes y aislados en cuando menos un hemocultivo de paciente con catéter o línea intravenosa y con tratamiento antimicrobiano apropiado.

- ✓ Pruebas serológicas positivas para detección de antígenos (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *Streptococcus* del grupo B), signos, síntomas y pruebas de laboratorio positivas no relacionadas a infección en otro sitio.

Criterio 2. Paciente mayor de un año de edad en quien se han aislado patógenos en uno o más cultivos de sangre que no estén relacionados a una infección en otro sitio.¹⁷

Criterio 3. Paciente adulto que presenta cuando menos uno de los siguientes signos y síntomas: fiebre (>38 °C), escalofríos, hipotensión y por lo menos uno de los siguientes:¹⁸

- ✓ Flora contaminante de piel (difteroides, especie de *Bacillus*, especie de *Propionibacterium*, estafilococo coagulasa negativa, micrococcos) aislada en dos o más hemocultivos tomados en ocasiones diferentes.
- ✓ Flora contaminante de piel (difteroides, especie de *Bacillus*, especie de *Propionibacterium*, estafilococo coagulasa negativa, micrococcos) aislada en cuando menos un hemocultivo de paciente con catéter o línea intravenosa y con tratamiento antimicrobiano apropiado.
- ✓ Pruebas serológicas positivas para detección de antígenos (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *Streptococcus* del grupo B), signos, síntomas y pruebas de laboratorio positivas no relacionadas a infección en otro sitio.

3.3 ETIOLOGÍA DE LAS BACTEREMIAS

La bacteremia se produce cuando la llegada y multiplicación de bacterias a la sangre supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarla. La invasión al torrente sanguíneo se produce desde un foco de infección extravascular, a través de los capilares o de las vías linfáticas, o desde un foco intravascular; como en la endocarditis, fístulas arteriovenosas, aneurismas micóticas, flebitis supurativa, catéteres intravenosos infectados y catéteres arteriales permanentes. Se presentan a cualquier edad, estando especialmente predispuestos a padecerla los pacientes prematuros, neonatos y geriátricos con graves enfermedades de base y los sometidos a maniobras que causan alteraciones de los mecanismos generales y locales de defensa frente a la infección. Varios mecanismos desempeñan un papel en la eliminación de microorganismos del torrente sanguíneo. En huéspedes saludables e inmunocompetentes, un flujo repentino de bacterias es eliminado en forma habitual de la sangre de 30 a 45 minutos. El hígado y el bazo tienen un papel primario en la eliminación de bacterias; los neutrófilos intravasculares tienen uno menor. Las bacterias encapsuladas son más difíciles de eliminar; sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos promueve su eliminación. Los pacientes con enfermedades de debilitamiento o inmunodeficiencias tienen riesgos mayores, por que las bacterias circulantes pueden no ser eliminadas de la sangre en horas.¹⁹

La naturaleza de los microorganismos cultivados en sangre con frecuencia sugiere el sitio de infección a partir del cual pudieron penetrar las bacterias al torrente sanguíneo, por

ejemplo, es probable que los neumococos provengan de una infección pulmonar, las enterobacterias de las vías urinarias y una mezcla de *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis* de una lesión relacionada con los intestinos.

Además de su función de digestión y absorción, el tracto digestivo es una enorme barrera contra la infección bacteriana sistémica, en estados críticos de la enfermedad, si esta falla; toxinas y bacterias escapan del tracto gastrointestinal y ascienden a la circulación general, principalmente por vía mesentérica linfática y la circulación porta. Componentes como la microflora intestinal, el pH gástrico, la alimentación enteral, la secreción intraluminal de inmunoglobulina A y la depuración de microorganismos por el sistema reticuloendotelial; contribuyen a esta barrera e impiden que los microorganismos invadan al huésped, una gran variedad de alteraciones directas e indirectas pueden acabar con este equilibrio, la evidencia de esto es muy alta en pacientes con estado de choque por cualquier causa, que presentan bacteremias y endotoxemias, en ausencia de lesiones o sitios obvios que los generen. Reportes clínicos sugieren aumento de la permeabilidad intestinal después de quemaduras y estados sépticos. De estos hechos parte la imperiosa necesidad de utilizar el tubo digestivo lo más tempranamente posible en los pacientes en estado crítico, viéndolo no sólo como una opción nutricional, sino como una forma de evitar infecciones nosocomiales.

La mayoría de las bacterias son capaces de producir bacteremias o sepsis cuando la virulencia de la bacteria es suficiente o cuando factores del huésped predisponen a la

sepsis. La distribución de los agentes causales de la bacteremia ha variado en los últimos años. Actualmente los cocos grampositivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los bacilos gramnegativos.²⁰

3.4 PATOGENIA DE LOS PRINCIPALES AGENTES CAUSALES DE BACTEREMIAS

3.4.1 ESTAFILOCOCOS

Los estafilococos coagulasa negativa son las bacterias más comúnmente aisladas en los laboratorios microbiológicos. Entre ellos el *S. epidermidis*, que se ha considerado por mucho tiempo como un microorganismo contaminante de cultivos, ahora se le reconoce como un patógeno importante y es considerado el agente causal de diferentes entidades clínicas, entre ellas: infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmítis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fistulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama).²¹

Tabla 1 Propiedades de los estafilococos asociados con factores de virulencia.²²

Factor	Acción o síndrome asociado	<i>S. aureus</i> (%)*	Estafilococo coagulasa negativo (%)*
Capsula celular	➤ Altera opsonización y fagocitosis	+++++	+
Catalasa	➤ Degrada H ₂ O ₂ a H ₂ O + O ₂ ➤ Impide incremento respiratorio de Polimorfonucleares	++++	++++
Coagulasa	➤ Cataliza conversión de fibrinógeno a fibrina ➤ La matriz de fibrina inhibe la migración de fagocito ➤ Promueve formación de absceso	++++	0
β lactamasa inducible	➤ Separa anillo β lactámico ➤ Transmisible por plasmido ➤ Confiere resistencia a penicilina	+++	+++
Resistencia intrínseca a β lactámicos	➤ Producción de proteínas de unión a penicilina de baja afinidad ➤ Confiere resistencia a todos los β lactámicos (incluida metilina)	++	+++
Exotoxinas	➤ Hemólisis ➤ Necrosis de piel ➤ Inhibición de fagocitos	+	0
Toxinas epidermolíticas	• Exfoliación	+	0
TSST-1	• Síndrome de choque tóxico	+	0
Enterotoxinas	• Náuseas y vómito	+	0
Producción de película biológica	• Adhesión a material protésico	†	+++

Simbolos: 0 Ninguno + variable ++ algo(<50%) +++ común(>50%)
++++ uniforme(<95%) † cepas mucoides

3.4.2 ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos son organismos anaerobios facultativos grampositivos que a menudo aparecen formando cadenas o pares, son catalasa negativa. Los estreptococos se subdividen en grupos mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie. Estos grupos incluyen una o más especies. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B y D. Entre los grupos de estreptococos, la enfermedad contagiosa (específicamente faringitis) es causada por el grupo A, *Streptococcus pneumoniae* (es la causa principal de neumonía), *Streptococcus mutans* y otros estreptococos llamados *viridans* (entre las causas de caries dental).

Después del crecimiento de estreptococos en agar con sangre de oveja se observan tres tipos de reacción de hemólisis (alfa, beta y gamma). La **hemólisis alfa** se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado bili-verdina); la **hemólisis beta** se refiere a un halo de hemólisis completamente claro y la **hemólisis gama** se refiere a la ausencia de hemólisis. Los estreptococos del grupo A y B son beta hemolíticos, mientras que los grupo D son generalmente alfa o gamma. Los *Streptococcus pneumoniae* y *viridans* ("verde") son alfa hemolíticos. Por lo tanto la reacción de hemólisis es importante para la clasificación de los estreptococos. La reacción de hemólisis junto con otra de las características fisiológicas es suficiente para una identificación clínica presuntiva.²²

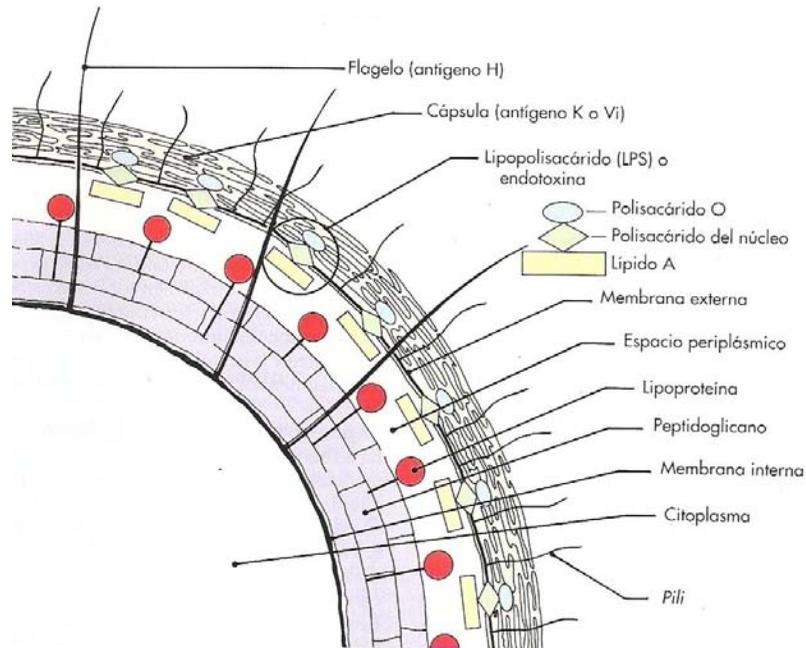
Tabla 2. Antígenos de *Streptococcus* con actividad biológica

Producto antigénico	Acción	Propiedades
Estreptolisina S	Hemolisis	Péptido de bajo PM Mal inmunógeno Anti-leucocitaria
Estreptolisina O	Hemolisis	Buen inmunógeno Induce antiestreptolisinas Anti-leucocitaria
Estreptoquinasa	Fibrinólisis	Hidroliza coágulos de fibrina
Hialuronidasa	Destruye ácido hialurónico	Facilita invasión estreptocócica
DNasa	Hidroliza DNA	Determinante de patogenicidad
Tox. eritrogenica	Exantema	Citotóxica termolábil
Capsula	Antifagocítica	Determinante de patogenicidad Inmunógeno específico en neumococos

3.4.3 ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias históricamente son las responsables del 30 al 35% de todas las sepsis, más del 70% de todas las infecciones del tracto urinario y muchas infecciones intestinales. Comparten características estructurales y antigénicas que las distinguen de otras familias (Figura 1).^{22, 23}

Fig. 1 Estructura antigénica de enterobacterias²²



3.4.4 BACTERIAS NO FERMENTADORAS DE LACTOSA

Las de mayor interés clínico son las *Pseudomonas aeruginosa* ya que poseen un número de factores estructurales y toxinas que aumentan su virulencia y las hacen más resistente a la mayoría de los antibióticos empleados de modo habitual. De hecho, es sorprendente que estos microorganismos no sean patógenos con más frecuencia, dada su presencia ubicua, la capacidad para crecer en prácticamente cualquier medio, las propiedades de virulencia y la amplia resistencia a los antimicrobianos. En la

práctica, las infecciones por *Pseudomonas* tienen un carácter primariamente oportunista (es decir, se limitan a pacientes con defensas comprometidas).^{24,25}

Tabla. 3 Determinantes de patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*.²²

Factores celulares	Actividad biológica
Fimbrias (pill)	Adherencia al epitelio
Flagelo	Movilidad, invasividad
Polisacárido envoltura	Adherencia, toxicidad neutrófilos
Exopolisacárido mucoide (alginate)	Adherencia forma biopelícula, inhibe fagocitosis, reduce actividad antibióticos
LPS (lipido A)	Efecto endotoxina: fiebre, hipertensión, leucopenia shock
Antígeno O	Protege a la bacteria del complemento
Proteínas shock térmico	Adaptación al stress bacteriano, le ayuda a sobrevivir, induce respuesta huésped
Factores extracelulares	
Proteasas (elastasa, proteasa alcalina)	Adherencia tisular invasividad Necrosis, degradan IgG e IgA
Exotoxina A	Bloquea síntesis proteica, necrosis tisular, Citotóxica (macrófagos). Invasividad, leucocitosis. Induce formación Ac. Antitoxina A.
Exoenzima SR	Necrosis pulmonar, invasividad, diseminación hemática
Citotoxina	Toxicidad letal para leucocitos
Fosfolipasas	Efecto membrana, hemolisis, flogógenas
Ferripiouquelina (fpq)	Captación de hierro
Pioverdina	Captación de hierro
Piocianina	Lesiona epitelio, dificulta la función ciliar y asociada a fpq libera radicales OH

3.4.5 BACTEROIDES

A pesar de las muchas especies anaerobias que colonizan el cuerpo humano, relativamente pocas causan enfermedad. Por ejemplo, *B. distasonis* y *B. thetaiotaomicron* son los bacteroides que predominan en el tracto gastrointestinal; a pesar de todo, más del 80% de las infecciones intraabdominales se asocian con *B. fragilis*, un microorganismo que representa menos del 1% de la flora gastrointestinal. La virulencia aumentada de ésta y otras bacterias anaerobias han sido objeto de estudio cuidadoso.²⁵

Tabla. 4 Factores de virulencia de los bacilos gramnegativos anaerobios.²²

Factores	Microorganismo
<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión <ul style="list-style-type: none"> ○ Polisacárido capsular ○ Fimbrias ○ Hemaglutininas ○ Lectinas ○ Coagregación 	<p><i>b. fragilis</i> <i>b. fragilis, p. Gingivalis</i> <i>p. gingivalis, P. fragilis</i> <i>F. nucleatum</i> Varias especies orales</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Invasión <ul style="list-style-type: none"> ○ Fostolipasa C; proteasas 	<p><i>F. necroforum</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> • Establecimiento de la infección/tejido dañado <ul style="list-style-type: none"> ○ Exoencimas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas ▪ Proteasas ▪ Colagenasas ▪ Fibrinolisinias ▪ Neuraminidasas ▪ Heparinasas ▪ Condroitin sulfatasas ▪ Glucuronidasas ▪ N-acetilglucosaminidasas ○ Factores antifagocíticos y antilíticos <ul style="list-style-type: none"> ▪ Capsula ▪ Productos metabólicos ▪ Lipopolisacárido ▪ IgA, IgM, IgC proteasas ○ productos metabólicos <ul style="list-style-type: none"> ▪ ácidos grasos volátiles ▪ compuestos con azufre ▪ aminas ○ estimulación del daño mediado por el huésped <ul style="list-style-type: none"> ▪ lipopolisacáridos ▪ estructuras asociadas a la superficie 	<p>Varias especies <i>Porphyromonas sp.</i> <i>P. gingivalis</i></p> <p><i>B. Fragilis, Porphyromonas sp.</i> y otros</p> <p><i>b. fragilis, P. gingivalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>B. fragilis</i> y otros bacilos gramnegativos <i>Porphyromonas sp. B. Fragilis</i></p> <p><i>La mayoría de anaerobios</i> <i>La mayoría de anaerobios</i> <i>La mayoría de anaerobios</i></p> <p><i>f. necroforum, P. gingivalis</i> <i>p. gingivalis</i></p>

3.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS PRINCIPALES BACTEREMIAS

3.5.1 BACTEREMIA GRAMNEGATIVA

Por lo general, el término bacteremia gramnegativa se reserva para aquellos casos de bacteremia producida por miembros de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. Las bacteremias producidas por otras bacterias gramnegativas, como gonococos y meningococos, se consideran como entidades aparte. Con frecuencia, el tracto intestinal y urinario, además de la piel, son los sitios donde se originan las bacterias. Al parecer; la cirugía, la manipulación del tracto urinario (por ejemplo, cateterización) y enfermedades subyacentes son factores que precipitan el desarrollo de la bacteremia gramnegativa.^{26,27}

Las manifestaciones clínicas de la sepsis gramnegativa son idénticas, sin importar cuales son las especies de las bacterias gramnegativas que producen la enfermedad. Sin embargo, la severidad de los síntomas puede variar de manera considerable de paciente a paciente.²⁸

Los síntomas típicos incluyen fiebre alta, escalofrío con sacudidas, postración y en ocasiones, náusea y vómito. En los casos clásicos, estos síntomas se presentan en el lapso de 1 a 2 horas después de que la bacteria penetra en el torrente sanguíneo. Dentro del lapso de 3 a 8 horas que duran los síntomas iniciales, puede evidenciarse un choque endotóxico o hipotensión. Desafortunadamente, estos síntomas clásicos sólo se presentan en un 30 a 40% de los pacientes con sepsis gramnegativa. En la mayoría de los casos la enfermedad

presenta manifestaciones clínicas más sutiles. Por ejemplo, la presencia de fiebre puede ser el único síntoma de sepsis en pacientes que han tenido procedimientos genitourinarios o gastrointestinales.²⁹

3.5.2 BACTEREMIA ESTAFILOCÓCICA

La bacteremia estafilocócica diagnosticada, por lo general se produce por *Staphylococcus aureus*. Los estafilococos coagulasa negativa (*S. epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*) en ocasiones, producen bacteremia y actualmente son sospechosos de producir muchos de los casos de infección no diagnosticada. Estos estafilococos coagulasa negativa dan cuenta de aproximadamente el 0.1% de los casos diagnosticados, aunque su importancia clínica suscita gran controversia.^{30,31}

La bacteremia estafilocócica puede ser de origen primario, siendo la piel la principal fuente de infección o de origen secundario en un foco infeccioso. Los abscesos cutáneos son una fuente importante de microorganismos y el sólo tocarlos puede hacer que la sangre se llene de estafilococos. De manera virtual, todos los casos de bacteremia debida a estafilococos coagulasa negativa; resultan del uso de catéteres, cánulas intravenosas contaminadas, válvulas hidrocefálicas, etc.³²

Las manifestaciones clínicas de la sepsis estafilocócica se correlacionan con el origen de la bacteria, el foco de infección inicial y la diseminación de la bacteria. En ocasiones, la sepsis debida a *S. aureus* es una enfermedad fulminante que se

caracteriza por el establecimiento repentino de fiebre, escalofrío y taquicardia. La situación del paciente se deteriora rápidamente dando como resultado un choque, el cual puede ser fatal en un lapso de 24 a 48 horas. Por lo general, la enfermedad progresa más lentamente sin presentar síntomas específicos, siendo el choque menos común en comparación con los casos de sepsis gramnegativa.³³

3.5.3 BACTEREMIA GONOCÓCICA.

Algunas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* son capaces de invadir tejidos y producir bacteremia. La bacteremia conocida como gonococemia puede conducir a una infección gonocócica diseminada. Las cepas de *N. gonorrhoeae*, capaces de producir gonococemia, son resistentes a la actividad aniquiladora del suero, muy sensibles a la penicilina y tienen requerimientos nutricionales específicos. La gonococemia, por lo general evoluciona a partir de gonorrea asintomática. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la gonococemia son poliartritis, dermatitis y fiebre; pocas veces se presenta choque. La gonococemia rara vez es fatal.

³⁴

3.5.4 BACTEREMIA MENINGOCÓCICA.

Neisseria meningitidis invade la circulación sanguínea desde la orofaringe, produciendo una variada gama de síntomas clínicos. La enfermedad llamada meningococemia puede darse como una bacteremia más bien transitoria y leve o como una enfermedad fulminante que produce la muerte rápidamente. Por lo común, la meningitis se produce a partir de la meningococemia:³⁵

- a) En su presentación más leve, el paciente con meningococemia presenta fiebre y malestar; estos síntomas ceden espontáneamente en 1 ó 2 días.
- b) La meningococemia aguda es una situación más severa. El paciente presenta fiebre, malestar, debilidad, náusea, vómito, escalofrío, dolor de cabeza, mialgia y artralgia; por lo general, presenta antecedentes de infección del tracto respiratorio superior. La manifestación clínica más característica de meningococemia aguda es hemorragia petequiral.
- c) La forma más severa de meningococemia es una enfermedad fulminante, la cual presenta una alta tasa de mortalidad. Esta forma, también conocida como síndrome de Waterhouse-Friderichsen, se presenta en el 5 al 15% de los pacientes con meningococemia. Los pacientes presentan un abrupto establecimiento de fiebre hasta de 40.6 °C, escalofrío, náusea, vómito, mialgia, debilidad y cefalea. De manera repentina, aparecen hemorragias petequirales, las cuales tienen amplia distribución. Los síntomas de choque pueden

llegar a ser importantes, aunque la presencia de meningitis es rara.³⁵

3.5.5 BACTEREMIA DEBIDA A BACTEROIDES

El predominio de bacteroides en el tracto gastrointestinal y orofaringe hace que la bacteremia producida por estos organismos anaerobios tenga una ocurrencia frecuente. La bacteremia que se origina en la orofaringe, por lo general se produce por *B. melaninogenicus*; la bacteremia que se origina en sitios que están más abajo del diafragma, por lo general es producida por *Bacteroides fragilis*. La bacteremia puede no diagnosticarse y desarrollarse como resultado de traumatismos menores de la cavidad oral, tracto genitourinario, tracto gastrointestinal o piel.³⁶

3.5.6 BACTEREMIA POR CLOSTRIDIOS.

La bacteremia producida por cualquiera de las más de 70 especies del género *Clostridium* puede darse sin un pronóstico que indique gravedad. De hecho, actualmente se sabe que una bacteremia producida por clostridios, puede darse sin presencia de sintomatología clínica y no es necesario tratarla. Las especies menos virulentas, *Clostridium septicum* y *Clostridium ramosum*; pueden producir choque o enfermedad fatal en recién nacidos, en pacientes con enfermedades malignas y en pacientes con inmunocompromiso. Se aíslan de 1 al 2.5% de los hemocultivos positivos; en 30 al 40% de los cultivos de sangre positivos para clostridios, se encuentran mezclados con otras bacterias anaerobias, con bacterias aerobias o con

ambos tipos de bacterias. La bacteremia y sepsis causadas por clostridios, se originan en el colon, tracto biliar y útero. Los sitios de origen, clínicamente aparentes, se identifican en sólo la mitad de los casos; se supone que en el resto de los casos los sitios de origen son tracto intestinal y biliar, además de sitios ginecológicos.^{37,38}

3.5.7 BACTEREMIAS DE ETIOLOGÍAS DIVERSAS.

La mayoría de las bacterias poseen el potencial para producir bacteremia transitoria. La única condición es que se contamine la sangre con la bacteria, ya sea por medio de traumatismo o a partir de un foco infeccioso. Además, la bacteremia es parte integral de muchos procesos de enfermedad infecciosa. En algunas enfermedades, la bacteremia produce signos clínicos y síntomas característicos de la enfermedad. Tal vez las características clínicas más predecibles de la bacteremia, sin importar la etiología, son la presencia de fiebre y escalofrío.³⁹⁻⁴¹

3.6 CATÉTERES

3.6.1 BACTEREMIAS RELACIONADAS AL USO DE CATÉTERES

Los catéteres endovenosos fueron utilizados por primera vez hace aproximadamente 50 años y desde entonces se hizo evidente su asociación a procesos infecciosos.⁴² Las bacteremias secundarias, por lo general, tienen su origen en dispositivos intravasculares, pero su fuente en ocasiones pasa desapercibida por falta de seguimiento de los casos en forma metódica y regular.⁴²⁻⁴⁵

La vía intravenosa para la aplicación de medicamentos y soluciones se emplea en un 30 a 50% de los pacientes hospitalizados, y en pacientes que se encuentran en una Unidad de Terapia Intensiva (UTI) hasta un 100%, para una monitorización estrecha de las funciones vitales que se realiza de manera continua durante las 24 horas del día. Muchas veces esto implica la colocación de catéteres y cánulas artificiales en la circulación venosa central, en las arterias, así como en otros conductos y cavidades corporales, como la tráquea y la uretra, o la colocación de transductores intracraneanos para tener un registro directo de la presión intracraneal. Todos estos instrumentos sufren colonización por flora endógena o bien por la que predomina en el área física, o proveniente del personal que los manipula.

De manera general las cánulas y catéteres rompen la integridad de la barrera cutánea. Los estudios epidemiológicos indican que la instrumentación cuenta con sondas y catéteres

que son el factor de riesgo más importante en las infecciones nosocomiales de las UTI.^{46, 47}

Independientemente del tipo de implemento utilizado, sea cánula corta o catéter, e insertado por vía percutánea o mediante venodisección, todos los implementos intravasculares tienen factores de riesgo comunes para la infección (Figuras 2 y 3), como los mencionados a continuación:⁴⁶

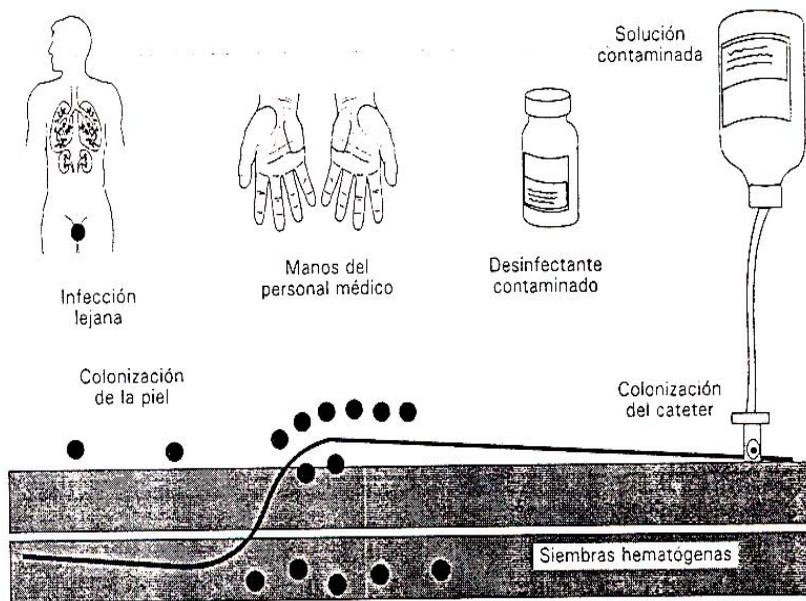
3.6.2 FACTORES DE RIESGO DE IMPLEMENTOS INTRAVASCULARES:

Pérdida del mecanismo de defensa constituido por la piel íntegra.

- a) Los microorganismos que forman parte de la flora cutánea normal del paciente y las bacterias adquiridas en el hospital pueden tener acceso al interior de la vena o arteria.
- b) La capacidad de algunas bacterias para adherirse al material de la cánula o catéter (plástico) les puede permitir que evadan la acción de células fagocíticas, de factores bactericidas del suero o de antibióticos, y esto les permite diseminarse en el interior del torrente sanguíneo.
- c) El coágulo fibrinoplaquetario que se forma en la vena o arteria sobre la superficie externa de la cánula o

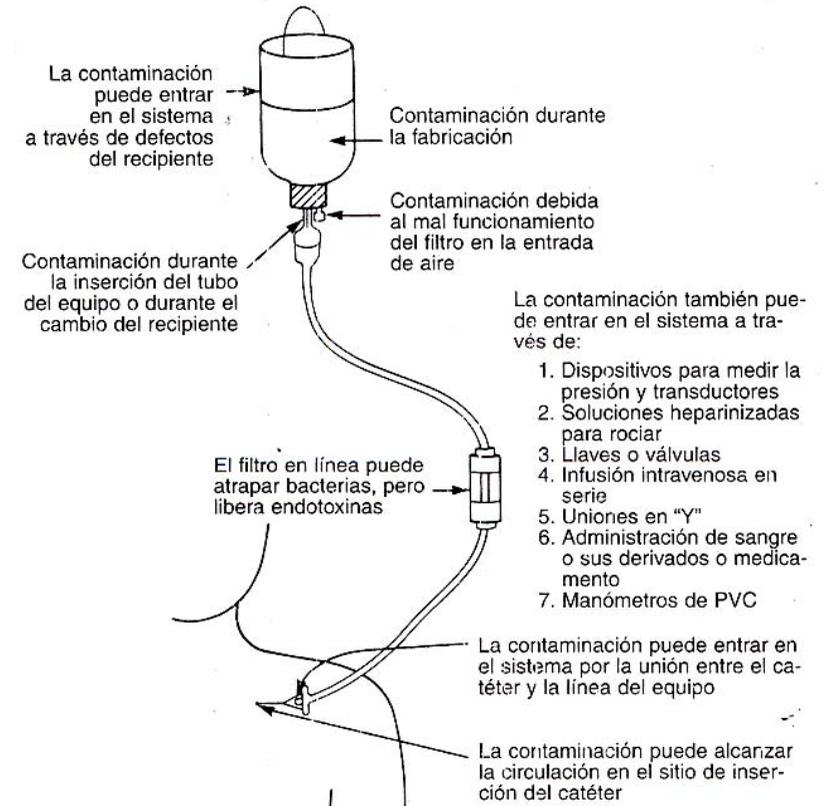
catéter puede contaminarse no sólo por organismos de la piel, sino también por microorganismos procedentes de infecciones a distancia o por líquidos o medicamentos previamente contaminados que pasen a través de la cánula. El coágulo contaminado puede servir como nido para propagación y diseminación de microorganismos.⁴⁶

Fig.2 Principales fuentes de contaminación para



dispositivos intravasculares.⁴⁶

Fig.3 Puntos de acceso de contaminación microbiana en la terapia de infusión.⁴⁵



3.6.3. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS DE CATÉTERES

Una vez extraído el catéter, cortar 3 o 4 cm de la porción distal en condiciones asépticas. Depositar en recipiente estéril sin

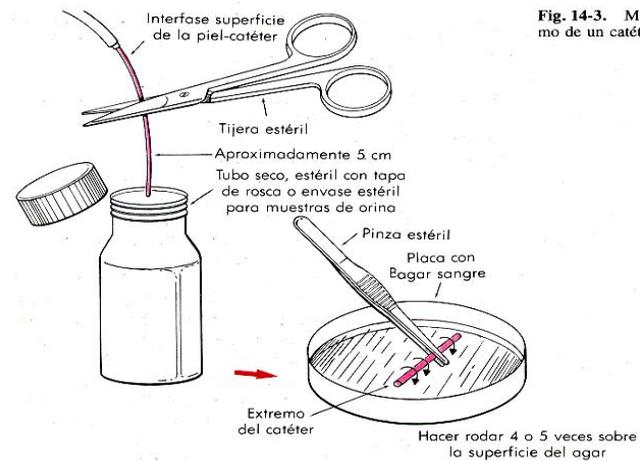
conservador y transportar al laboratorio de bacteriología de inmediato. Si ello no fuera posible conservar a 4 °C.

3.6.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES CAUSADAS POR CATÉTERES.

Los métodos de diagnóstico para identificar microorganismos asociados a infecciones producidas por catéteres han variado desde métodos cualitativos hasta cuantitativos.⁴²

En el método semicuantitativo de Maki se cortan los 4.5 cm distales del catéter y se siembran por rodamiento sobre la caja de cultivo de agar gelosa sangre y si existe un crecimiento de más de 15 unidades formadoras de colonias (UFC), se considera positivo (Figura 4).

Fig. 4 Método de Maki para cultivo de catéter.⁴⁸



El límite de 15 colonias fue relativamente arbitrario, aunque se correlacionó finalmente con la clínica.⁴² Sus principales limitaciones son que no detecta contaminación intraluminal, hay riesgo de contaminación y dificultad de realización en catéteres curvos.⁴⁹

Clery y colaboradores modificaron la técnica de Maki al tratar de hacerla cuantitativa, por lo que cultivaron los catéteres en un medio líquido de volumen bien definido. El medio líquido utilizado generalmente es el caldo infusión cerebro Corazón (BHI).⁵⁰ Sugirieron que esta modificación tiene tres ventajas sobre el método semicuantitativo: **a)** permite detectar los microorganismos intraluminales, **b)** permite encontrar microorganismos en diferentes segmentos del catéter y **c)** permite identificar diversos microorganismos en infecciones mixtas. Este método cuantitativo tiene la desventaja de ser más laborioso y no siempre es fácil implementarlo como rutina. Se considera positivo con 100 UFC/mL.⁴²

El estudio bacteriológico de los catéteres, va a permitir en ocasiones conocer el agente causal de una bacteremia relacionada con el catéter y por otra parte, prevenir que aparezca esta.²²

Existen datos clínicos y microbiológicos que sugieren que la mayor parte de las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares son producidas por microorganismos procedentes de la piel en el punto de inserción que colonizan la superficie externa del catéter.

El patógeno más frecuentemente implicado en las infecciones por catéteres es *Staphylococcus epidermidis*. Esto se relaciona con la capacidad que tiene este microorganismo de adherirse a los catéteres de plástico. En estudios previos se ha observado que dicha adhesión ocurre muy rápidamente.

La colonización del catéter por *Staphylococcus aureus* se relaciona frecuentemente con la bacteremia y con la aparición de focos sépticos secundarios. Los catéteres que inhiban la absorción de proteínas o promuevan la adsorción de albúmina sobre su superficie supondrán una mejoría en la biocompatibilidad entre el cuerpo extraño y el huésped, evitando la formación de trombosis local y disminuyendo el riesgo de colonización bacteriana posterior de microorganismos oportunistas y patógenos que pueden producir infección.⁵¹

Una de las complicaciones de los catéteres intravasculares es la infección, ya sea local o diseminada por el torrente circulatorio. El rango de las complicaciones relacionadas con estos dispositivos médicos comprende desde infecciones en el punto de inserción hasta bacteremias y muerte, siendo responsables en algunos estudios hasta de 40% de las bacteremias nosocomiales.⁵¹⁻⁵³

3.7 EVIDENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS Y FRECUENCIAS

La frecuencia de bacteremias informada en diversos hospitales del mundo y de México, muestran tasas diversas ya que la detección de bacteremias depende entre otros factores, de la intensidad con que se busca, de la metodología que se emplea para identificarla y de las circunstancias clínicas por las cuales se emprenda su búsqueda informando tasas falsas de bacteremias hasta del 0%, cuando en realidad podrían existir verdaderas epidemias ocultas.^{44, 54-58}

Las bacteremias son un problema de salud mundial que afectan principalmente a pacientes prematuros, neonatos y geriátricos pero también a cualquier paciente que su sistema inmunológico este en riesgo por diferentes factores.^{59,60}

Actualmente se ha encontrado que los cocos grampositivos igualan o superan en frecuencia a los bacilos gramnegativos por la utilización de dispositivos intravasculares, como catéteres, cánulas, fístulas, entre otros empleados en la terapia de recuperación de pacientes.^{43,61}

El aislamiento de cocos grampositivos ha sido de 41.92% y el de los bacilos gramnegativos de 46.78%.^{56,62,63}

Se ha encontrado que los bacilos gramnegativos que más destacan son *Escherichia coli* 14.2%, *Pseudomonas aeruginosa* 8.26%, *Klebsiella pneumoniae* 3.69%. Entre los cocos grampositivos está *Staphylococcus aureus* 7.49%,

enterococos 7.1%, estafilococos coagulasa negativa 5.8% y los *Streptococcus α* hemolítico con 4.28%. De los microorganismos aislados en bacteremias de pacientes con infecciones nosocomiales; existe un franco predominio de *Staphylococcus epidermidis* 20.33%.^{58,64-66} Sin olvidar a la *Candida albicans* que ocupa el sexto lugar en frecuencia con el 5.05%. El método más común para aislar e identificar a los agentes causales de bacteremias es el hemocultivo.

3.8 GENERALIDADES DEL HEMOCULTIVO

Los hemocultivos son cultivos de sangre que permiten un diagnóstico clínico así como un diagnóstico etiológico específico.^{46,67} Es la prueba más útil y más frecuentemente usada para demostrar la presencia de una infección sistémica. La utilidad de realizar hemocultivos deriva de los siguientes hechos:⁶⁸

- a) El aislamiento de una bacteria en los hemocultivos aporta una valiosa información a la hora de elegir el tratamiento antimicrobiano adecuado. La información de los resultados, preliminares o definitivos, se realiza con la mayor rapidez posible ya que de ello derivan posibles cambios en el tratamiento que pueden ser vitales para el pronóstico del paciente.
- b) El hemocultivo no es una técnica costosa y su obtención no conlleva ningún riesgo para el paciente.
- c) Las características clínicas de la bacteremia y las situaciones en que puede presentarse son tan variadas que no permiten establecer un diagnóstico clínico con suficiente certeza.

3.8.1 RECOMENDACIONES AL EXTRAER LA MUESTRA DE SANGRE

Las muestras de sangre para hemocultivo deben obtenerse por venopunción.^{48,68} Las venas del antebrazo son las que se utilizan generalmente para este fin. La sangre arterial se ha recomendado para el diagnóstico en la endocarditis por hongos, pero en realidad no se han comprobado sus ventajas sobre la sangre extraída por venopunción.⁶⁸

No es aconsejable extraer la muestra de sangre a través de catéteres ya que estos dispositivos pueden albergar bacterias que los han colonizado pero que no están presentes en la sangre del paciente y por lo tanto la sangre extraída a través de estos dispositivos especiales dará resultados falsos positivos.⁴⁸ Solo se extrae la muestra de catéteres cuando se sospecha de sepsis asociada con el uso de catéteres.

3.8.2 MEDIDAS DE SEGURIDAD AL TOMAR UN HEMOCULTIVO

Las medidas de seguridad y de asepsia al tomar un hemocultivo son indispensables e independientes del método utilizado ya sea convencional o no convencional.^{46,68}

La contaminación de los hemocultivos por microorganismos de la flora cutánea durante la extracción se debe evitar, en la medida de lo posible, con la adecuada preparación de la piel mediante una antisepsia adecuada.^{48,68,69} El procedimiento de extracción es diferente según el hospital y el método de

hemocultivo utilizado (el procedimiento de asepsia de la piel y toma de muestra se mencionará en el apartado de método y procedimiento).

3.8.3 ETIQUETADO DE LAS BOTELLAS DE HEMOCULTIVO

Las botellas se marcan con una etiqueta en la que se anote el nombre del paciente, el número de la cama y la hora de la extracción de la muestra para identificar correctamente las parejas de botellas de cada una de las extracciones.^{68,69}

Cada extracción se acompañará de una solicitud de laboratorio en el que consten, al menos, los siguientes datos: nombre y apellidos del paciente, fecha y hora de extracción, servicio de procedencia, número de cama, nombre del médico que realiza la petición, diagnóstico del paciente y tratamiento antimicrobiano previo.⁶⁸

3.8.4 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

El transporte ha de ser de inmediato o en el menor tiempo posible. Nunca debe refrigerarse antes de su envío, podrá conservarse en estufa dependiendo del sistema de hemocultivo que se disponga.^{50,70}

3.8.5 MOMENTO EN QUE DEBE TOMARSE UN HEMOCULTIVO

- a) Como norma los hemocultivos se obtendrán antes de iniciar la terapia antimicrobiana, el incumplimiento de este punto puede dar lugar a resultados falsamente negativos pudiendo comprometer la vida del paciente. En caso de sepsis agudas, osteomielitis, meningitis, neumonía, pielonefritis; el hemocultivo debe considerarse un procedimiento de urgencia. En pacientes con tratamiento antimicrobiano; la extracción se hará justo antes de la administración de una dosis, a veces es conveniente retirar el tratamiento. Para pacientes en situación crítica; en cualquier momento.^{50,69}
- b) En bacteremias intermitentes: las muestras deben ser extraídas en un período de una hora antes del pico febril, ya que existe usualmente un tiempo de una hora entre el influjo de las bacterias a la circulación y el comienzo de la fiebre. Se ha demostrado que al momento del pico febril la sangre circulante ya puede estar libre de bacterias. Es por este motivo que no se recomienda que las muestras sean extraídas entre intervalos de tiempo, solamente al comenzar la fiebre.^{48,50,69}
- c) En bacteremias continuas: como en la endocarditis bacteriana y en otras infecciones intravasculares los microorganismos son liberados a la sangre en forma casi constante, el momento de toma de las muestras no importa.^{68,71}

3.8.6 VOLUMEN Y FACTOR DE DILUCION REQUERIDOS

Muchos estudios han demostrado que la probabilidad de aislar un microorganismo aumenta proporcionalmente con el volumen de sangre tomada, siempre que la sangre se diluya lo suficiente con el fin de neutralizar las propiedades bactericidas de esta y el posible tratamiento antimicrobiano del paciente.^{68,69}

Dado que la sangre puede neutralizar la toxicidad del polianetolsulfonato de sodio (SPS) hacia organismos sensible al mismo, la presencia del máximo volumen posible de sangre puede contribuir a optimizar el aislamiento de dichos microorganismos sensibles al SPS en los casos donde no sea posible se puede añadir más sangre humana entera o sangre desfibrinada de cordero.

Además del volumen de sangre cultivado y del tipo de medio elegido debe tenerse en cuenta el factor de dilución de la sangre en el medio. Con este propósito se ha encontrado que la relación 1:10 v/v (1:5 como mínimo) de sangre en el medio es la más conveniente.

Aunque en medios resinados se emplea una dilución de 10:25 v/v o sea una dilución menor a la obtenida de la relación 1:5 v/v.^{46,48,50,69,70}

Las botellas de hemocultivo no deben llenarse, ya que siempre debe existir atmósfera y espacio para la producción de gases.

Volumen recomendado:⁷⁰

- ✓ Pacientes neonatos y hasta 1 año de edad: 0.5 a 1 mL de sangre
- ✓ Pacientes entre 1 y 6 años de edad: 1 a 3 mL de sangre
- ✓ Jóvenes: 10 mL divididos en 2 frascos
- ✓ Adultos: 20 a 30 mL divididos en 2 ó 3 frascos

3.8.7 NÚMERO DE HEMOCULTIVOS RECOMENDADOS EN DIFERENTES CASOS

El número de muestras y el tiempo en que se obtienen dependen de la fisiopatología de la bacteremia. Múltiples botellas inoculadas de una punción deben considerarse como un solo hemocultivo.^{48,69}

La mayoría de los investigadores coinciden en que obtener más de tres cultivos de sangre de rutina en 24 horas no causa un incremento en la detección de la gran mayoría de los episodios de bacteremia.⁶⁹

Siempre se debe realizar un mínimo de 2 extracciones, preferentemente 3, con un intervalo de 15 a 30 minutos entre ellas. Los hemocultivos con solo una extracción tienen una rentabilidad diagnóstica pequeña y son imposibles de interpretar si se aísla un microorganismo que puede ser contaminante.^{50,69} El número de tomas para los siguientes casos son:

A) Pacientes prematuros, neonatos y niños muy pequeños:⁷⁰

1ª toma 1 frasco pediátrico

2ª toma 1 frasco pediátrico

B) Pacientes adultos con sospecha de bacteremia intermitente:

1ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

2ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

3ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

Las extracciones se realizan una hora antes del pico febril

C) Pacientes adultos con sospecha de endocarditis o con fiebre de origen desconocido:

1ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

2ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

3ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

En estas situaciones las extracciones estarán separadas un mínimo de una hora.

D) Pacientes con SIDA:

1ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

2ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

3ª toma detección de aerobio + detección de anaerobio

Además en cualquiera de las tomas puede hacerse detección de hongos y/o detección de micobacterias dependiendo de la sospecha clínica.

E) Pacientes con terapia antimicrobiana y hemocultivos negativos:

Tres extracciones en 2 o 3 días con máximo volumen de sangre, aunque lo que dará mayor rentabilidad es suspender el tratamiento (si se puede) 24 a 48 horas.

3.8.8 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Los hemocultivos tienen un período de incubación promedio de 5 a 7 días a 35 °C. Aunque la mayoría de microorganismos que causan bacteremia se detectan en los primeros dos o tres días de incubación. Se podrá prolongar el tiempo de incubación entre 15 a 30 días si se sospecha de una bacteria de lento crecimiento.^{46,50,69}

3.9 MÉTODOS DE HEMOCULTIVO

3.9.1 DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE BACTEREMIAS

- A) Métodos convencionales
 - ✓ Líquido
 - ✓ Bifásico
- B) Métodos no convencionales
 - a) Sistemas no automatizados
 - ✓ Lisis centrifugación
 - ✓ Subcultivo incluido
 - ✓ Detección de microorganismos por cambio en la impedancia eléctrica
 - ✓ Otros métodos para la detección de bacteremias que no requieren cultivo
 - b) Sistemas automatizados
 - ✓ Radiométrico
 - ✓ Infrarrojo
 - ✓ Fluorescencia

3.9.2 MÉTODOS CONVENCIONALES

3.9.2.1. MÉTODO CONVENCIONAL LÍQUIDO

La diversidad de bacterias que pueden ser aisladas de sangre exige un equipo igualmente diverso de medios que permitan su desarrollo. El medio líquido para hemocultivos contiene un caldo nutritivo y un anticoagulante.⁴⁸ El número de diferentes fórmulas de caldos existentes es asombroso e incluye tanto los que son preparados en cada laboratorio como los que se presentan en el comercio. La mayoría de las botellas para hemocultivo comerciales contienen digerido pancreático de soja, infusión cerebro corazón, peptona suplementada o caldo tioglicolato.^{48,69} Los medios más especializados incluyen a los caldos Columbia y para *Brucella*. El desarrollo de bacterias que carecen de pared celular puede ser estimulado mediante el agregado de estabilizadores osmóticos como sacarosa, manitol o sorbosa para crear un medio hiperosmótico (hipertónico).^{48,69} Los medios que no contienen estos aditivos se denominan isotónicos. Las botellas con medio hipertónico dificultan la inspección visual para detectar evidencia de crecimiento bacteriano, ya que los eritrocitos del medio están parcialmente lisados y no sedimentan en el fondo, dando entonces un aspecto turbio al caldo. Los medios carecen de glucosa ya que inhiben algunas bacterias debido al pH ácido siempre creciente, resultado de su metabolismo.^{48,67}

La atmósfera de las botellas para hemocultivos preparados comercialmente tiene por lo general un potencial redox muy bajo, que permite la multiplicación de la mayoría de los microorganismos facultativos y de algunos anaerobios. Para

estimular el desarrollo de los aerobios estrictos, como levaduras y *P. aeruginosa*, es necesaria una aireación transitoria de las botellas que se efectúa insertando asépticamente sobre un tapón de algodón una aguja estéril a través del tapón de goma y retirándola después de liberar el vacío de la botella.⁷² Por lo tanto, se recomienda el uso de dos botellas para cada hemocultivo, una aireada y otra no, para una óptima recuperación de los microorganismos causales de bacteremias.

En cada botella se inocula la muestra de sangre con el medio de cultivo y un anticoagulante.⁷² Cada botella contiene de 50 a 100 mL del medio. Se ha comprobado que la heparina, etilendiaminatetraacetato (EDTA) y el citrato inhiben el desarrollo de diversos microorganismos; el mejor anticoagulante es el polianetolsulfonato de sodio (SPS, liquoid).

Siendo este el anticoagulante de elección en concentraciones que varían de 0.025% a 0.05%.^{48,50,69} El SPS no actúa sobre las bacterias, evita la coagulación de la sangre porque ciertas bacterias no sobreviven dentro del coágulo en el que la fagocitosis de neutrófilos y macrófagos permanece activa. También inactiva los neutrófilos y ciertos antibióticos, como estreptomycin, kanamicina, gentamicina y polimixina. Precipita el fibrinógeno, β -lipoproteínas y otros componentes del complemento del suero lo cual puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias como el *Peptostreptococcus anaerobius*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Gardnerella vaginalis*.^{48,50,69} Este efecto

inhibitorio de SPS puede neutralizarse agregando gelatina al medio en una concentración final del 1% respecto del medio.

Los hemocultivos se incuban en estufas bacteriológicas a 35 °C tomando asépticamente unas pocas gotas del medio bien mezclado y sembrado este inóculo sobre una placa de agar gelosa sangre que se incubará a 35 °C durante 12 horas en una atmósfera con 5 a 10% de CO₂. Las botellas permanecen en incubación sin agitarlas durante 7 días, a menos que la condición del paciente requiera consideraciones especiales. El desarrollo de las bacterias anaerobias puede ser detectado eficazmente por inspección visual, de modo que en este caso no se recomiendan los subcultivos ciegos. Luego de 48 horas de incubación debe realizarse un subcultivo ciego y una tinción de Gram.^{46,69}

Los cultivos deben ser examinados visualmente por lo menos una vez por día. En general, el desarrollo bacteriano está indicado por hemólisis de los eritrocitos, burbujas de gas en el medio, turbidez, presencia de colonias pequeñas en el caldo o en la superficie de la capa de eritrocitos sedimentados (ocasionalmente sobre las paredes de la botella). Cuando existe evidencia macroscópica de desarrollo, la coloración de Gram de una gota del cultivo es muy útil y puede detectar cantidades pequeñas de bacterias, en caso de que el crecimiento sea insuficiente para producir turbidez en el medio de cultivo.^{48,69}

La fijación de frotis con metanol preserva la morfología bacteriana y celular, lo cual puede ser valioso sobre todo para detectar bacterias gramnegativas. El examen de un caldo

positivo mediante microscopia de fase revelará detalles de la morfología y movilidad bacteriana que permitirán al clínico tomar decisiones inmediatas respecto del tratamiento.⁴⁸

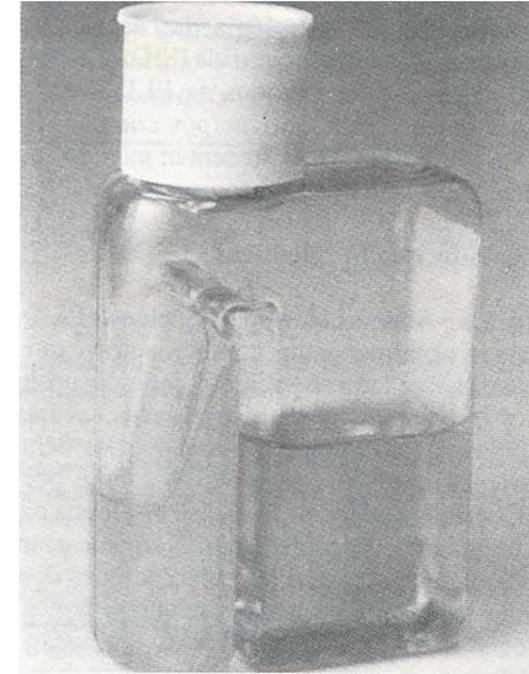
3.9.2.2 MÉTODO CONVENCIONAL BIFÁSICO

El medio bifásico contiene caldo soja tripticasa que se combina a veces con cisteína y agar gelosa sangre para formar un medio bifásico similar al del Dr. Maximiliano Ruíz Castañeda (Figura 5).⁴⁸

Se practica una dilución 1:10 de sangre en gelosa fundida y tibia dejándose solidificar hasta la consistencia de gel en un lado de la botella médica plana, añadiendo después el caldo, deberá emplearse caldo de hígado o glucosado en aquellos cultivos donde se sospeche de organismos como *Brucella*.^{48,67} Estos caldos deberán de incubarse en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ sustituyendo la tapa atornillable por un tapón de algodón esterilizado.

Las muestras de sangre son inspeccionadas dos veces al día con buena luz buscando señales de desarrollo. Si no se mueven las botellas, los eritrocitos se sedimentan en el fondo. Entonces pueden verse las colonias y con algo de práctica ser diferenciadas de las aglutinaciones de leucocitos que pueden ser abundantes en pacientes con infecciones.^{48,68} En forma clásica la sepsis por estafilococos da un coágulo en el caldo.

Fig. 5 Botella bifásica para hemocultivo que contiene un agar inclinado el cual puede ser sumergido en el caldo por inclinación de la botella⁴⁸



3.9.3 METODOS NO CONVENCIONALES, NO AUTOMATIZADOS

3.9.3.1 SISTEMA DE CULTIVO DE SANGRE LISADA Y CENTRIFUGADA

Con el propósito de separar rápidamente los microorganismos patógenos que se encontraban en la sangre de las sustancias antibacterianas naturales y de los agentes antimicrobianos, Sullivan, Sutter y Finegold' introdujeron un sistema que empleaba lisis de las células sanguíneas y filtración de la solución hemolizada a través de un filtro que retenía las bacterias.^{48,50}

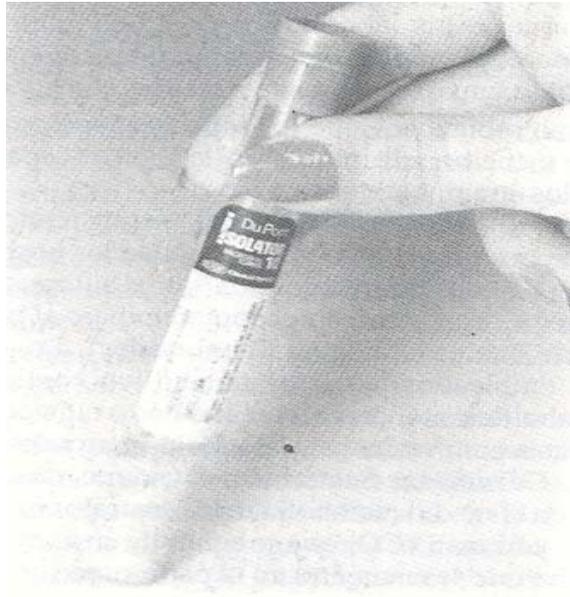
Aunque la tecnología era engorrosa, los resultados compensaban el esfuerzo. Este sistema de filtración fue el precursor de la técnica de lisis-centrifugación desarrollada por Dorn y cols que se encuentra en el comercio como Isolator (E. I. DuPont de Nemours & Co.).⁶⁹ El Isolator consiste en un tubo con doble tapón que contiene saponina para lisar las células sanguíneas, propilenglicol para disminuir la espuma, SPS como anticoagulante, EDTA para complejar los iones calcio y así inhibir la cascada del complemento y de coagulación, y una pequeña cantidad de un compuesto fluorado inerte para amortiguar y concentrar los microorganismos durante una centrifugación a 3,000 rpm durante 15 minutos. El tapón de la parte inferior está inclinado según el ángulo de centrifugación, permitiendo que el sedimento sea amortiguado por el Fluorinert en todo momento. Una vez finalizada la centrifugación, se descarta el sobrenadante, el sedimento que contiene los patógenos se agita vigorosamente en un "vortex" y se inocular en su totalidad en una placa con agar gelosa sangre.^{48,69}

Los beneficios de este sistema incluyen el mayor y más rápido aislamiento de ciertos microorganismos, la obtención de colonias para pruebas de identificación directa y de sensibilidad luego de la inoculación inicial, la posibilidad de cuantificar las UFC presentes en la sangre, la detección rápida de bacteremias polimicrobianas, el aumento de aislamientos de hongos filamentosos y levaduras, la eliminación del paso adicional para eliminar los antibióticos, la posibilidad de elegir medios especiales para los cultivos iniciales sobre la base de la impresión clínica (como la siembra directa en medios para *Legionella* o *Mycobacterium*)

y la mayor probabilidad de detectar patógenos intracelulares debido a la lisis de las células del huésped.^{73,74}

Los inconvenientes de este sistema parecen ser una alta proporción de placas contaminadas, manipulaciones múltiples con el riesgo de lesión con la aguja y el fracaso del sistema para detectar ciertas bacterias como *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* y bacterias anaerobias, en comparación con los sistemas convencionales. Con la introducción de un sistema semiautomatizado para eliminar el sobrenadante y aspirar el sedimento (Figura 6) Isolator, DuPont Co. Algunos de los aspectos negativos asociados con la manipulación del tubo han sido eliminados. La combinación de un tubo Isolator y una botella para hemocultivo en anaerobiosis sería un buen sistema.^{73,74}

Fig.6 Tubo Dupont Isolador para la técnica de lisis y centrifugación⁴⁸

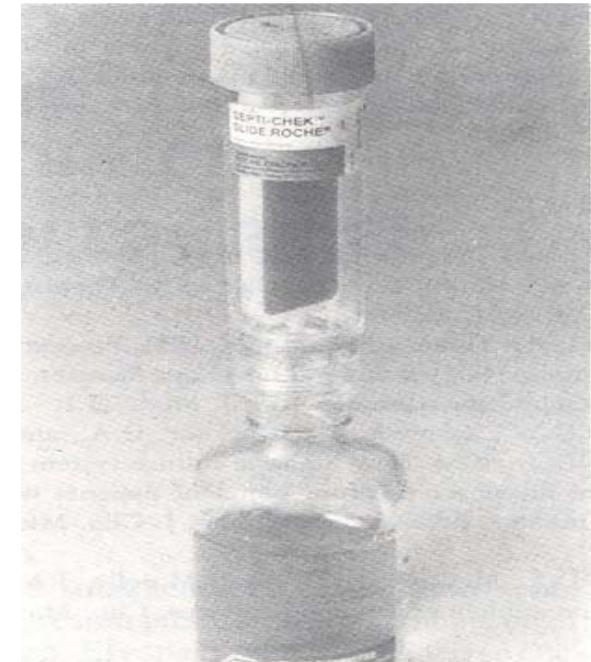


3.9.3.2 SISTEMA DE CULTIVO DE SANGRE CON SUBCULTIVO INCLUIDO

Una modificación reciente del hemocultivo bifásico es el sistema Septi-Chek (Roche Diagnostics) que consiste en una botella convencional para hemocultivo a la cual se ha unido una cámara que contiene una lámina de vidrio con tres caras cubiertas con agar chocolate, agar de MacConkey y agar malta. Para realizar el subcultivo se invierte la botella, poniendo en contacto todo el caldo con la superficie de los tres agares; éste es un procedimiento sencillo que no requiere abrir la botella ni emplear agujas.

El gran volumen que sirve como inóculo y la facilidad de su realización permite una detección mucho más rápida para muchos microorganismos que con los sistemas convencionales. El Septi-Chek aumenta la recuperación de *S. pneumoniae* pero no es eficiente para el aislamiento de anaerobios, (Figura 7).^{48,50,74}

Fig.7 Sistema con subcultivo incluido para hemocultivo⁷⁴



3.9.3.3 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS POR CAMBIOS EN LA IMPEDANCIA ELÉCTRICA

El paso de corriente eléctrica a través de un líquido puede ser medido. Los electrodos colocados en el caldo controlan en forma continua la impedancia eléctrica, aún durante la noche cuando no hay ningún analista clínico. El Bactometer es prácticamente el único instrumento que se encuentra en el comercio con este propósito. Los cambios de impedancia se inician cuando el número de colonias es aproximadamente 5×10^5 UFC/mL el mismo nivel de desarrollo que puede detectarse por observación de la turbidez. Este sistema y otros que determinan el crecimiento microbiano por cambios en la conductividad eléctrica o por microcalorimetría (calor desprendido durante el metabolismo bacteriano) no tienen gran aceptación en los laboratorios por el momento.^{59,65,66}

3.9.3.4 OTROS MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE BACTEREMIAS QUE NO REQUIEREN CULTIVO

Además de la detección de antígenos circulantes mediante reacciones de aglutinación con látex, disponibles para algunas levaduras, estreptococos del grupo B, *Haemophilus influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, ácidos teicoicos de estafilococos y *Neisseria meningitidis*, también se ha aplicado la contraelectroforesis (CIE) con diverso éxito en la búsqueda de antígenos en suero. Las sustancias que dan reacciones cruzadas pueden bloquear estos ensayos en algunos casos o provocar aglutinaciones no específicas.^{73,74}

El lisado de los amebocitos *Limulus polyphemus* forma un gel en presencia de sólo 0.1 ng de endotoxina. Esta prueba que es muy sensible, prueba denominada del lisado de los amebocitos del *Limulus*, puede ser empleada para detectar lipopolisacáridos (LPS) en pacientes con bacteremia debida a bacilos gramnegativos. Una infección por bacilos gramnegativos localizada en otras partes del organismo también puede dar una reacción positiva en suero. Aunque esta prueba se usa con frecuencia para diagnosticar meningitis causada por bacterias gramnegativas no se emplea comúnmente para detectar bacteremia, en parte por su naturaleza no específica.⁴⁸

También se ha intentado la detección de productos del metabolismo bacteriano en suero mediante la cromatografía con gas líquido (GLC), y se ha informado cierto éxito en algunos casos. Una aplicación prometedora es la detección de productos metabólicos de micobacterias, microorganismos cuyo diagnóstico por los métodos convencionales es muy lento.

3.9.4 MÉTODOS NO CONVENCIONALES AUTOMATIZADOS

3.9.4.1 SISTEMA DE CULTIVO DE SANGRE RADIOMÉTRICO

En este sistema los medios de cultivo empleados para el hemocultivo contienen metabolitos marcados con isótopos radiactivos (glucosa, aminoácidos y alcoholes marcados con C^{14}). Cuando las bacterias o levaduras se desarrollan en el medio metabolizan los sustratos radiactivos y liberan $^{14}CO_2$ que se acumula en la cámara de aire que se encuentra en la parte superior de la botella. En el sistema Bactec se inserta una aguja esterilizada en la botella tomando muestras periódicas de la atmósfera interna. La detección de $^{14}CO_2$ indica la presencia de microorganismos viables que metabolizan el sustrato marcado. Los hemocultivos se agitan durante las primeras horas de incubación para facilitar el desarrollo de los organismos aerobios y facultativos. El sistema BACTEC proporciona un caldo que contiene resina para eliminar el efecto de antimicrobianos por adsorción. No requiere manipulaciones adicionales una vez que la muestra de sangre ha sido introducida en el caldo. ^{48,69,74}

Cada laboratorio debe fijar los intervalos entre las mediciones radiométricas, los niveles de radiactividad considerados sospechosos, el número y secuencia de subcultivos, la composición de la mezcla de gas que se introduce en la botella en reemplazo de la muestra extraída y otras condiciones, en la forma que sea más conveniente para atender a las necesidades del tipo de población a tratar. ^{48,73,74}

Las desventajas que se encuentran con este sistema incluyen resultados falsos positivos debidos a valores de umbrales inadecuados, o al transporte de microorganismos de un frasco a otro por agujas para toma mal esterilizadas, resultados falsos negativos debidos a que ciertos microorganismos no metabolizan niveles detectables de sustrato marcado. Con este sistema se produce contaminación ambiental ya que elimina materiales radiactivos al término del período de incubación de los hemocultivos. Las reglamentaciones que rigen la forma de eliminación de estos medios registran variaciones de un estado a otro.

Las ventajas del sistema radiactivo BACTEC son la detección más rápida de muchos patógenos, la disminución del efecto de antimicrobianos en el cultivo de sangre, la posibilidad de detectar el crecimiento bacteriano sin inspección visual o realizando diversos subcultivos; se maneja de forma automatizada grandes números de botellas de hemocultivos, se emplean medios hipertónicos y se puede enlazar el sistema con una base de datos para el procesamiento de la información con el fin de controlar resultados y generar informes estadísticos en estudios epidemiológicos. ^{68,73,74}

Los fabricantes de BACTEC han introducido una modificación al sistema que permite la detección en el infrarrojo del CO_2 liberado por bacterias y hongos en vez de emplear radioisótopos. Este nuevo sistema disminuirá muchos de los problemas asociados con el manejo de los materiales radiactivos. En varios ensayos el nuevo sistema de detección ha dado resultados idénticos a los obtenidos con el sistema radiométrico. ^{68,7}

3.9.4.2 SISTEMA DE CULTIVO DE SANGRE INFRARROJO

En muchos laboratorios de microbiología de centros hospitalarios se utiliza, el sistema BACTEC para detectar la presencia de CO₂ por un procedimiento de infrarrojos. Existen diferentes versiones de este sistema. Las más conocidas son, BACTEC NR 660 y BACTEC NR 730 (Figura 8), este último consta de un ordenador que almacena los resultados, una estufa con un agitador y un módulo de lectura conectado a dos tanques que contienen una mezcla fija de gases previamente determinada por el fabricante.^{4,61,64} Este método detecta los niveles de CO₂ producidos por las bacterias en las botellas con medio líquido y los expresa como un índice de crecimiento al compararlos con los niveles de CO₂ en las botellas de control. En general, un índice de crecimiento superior a 30 o un valor diferencial entre dos lecturas consecutivas superior a 15 es considerado como positivo.⁶⁸

Estos parámetros pueden ser modificados por el usuario para conseguir una sensibilidad y especificidad óptimas. Este sistema utiliza un agitador para las botellas aerobias durante las primeras 24 a 48 horas, lo que aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos

La lectura de los hemocultivos con el sistema BACTEC está totalmente automatizada. Los datos del paciente, la fecha y el número de botellas se introducen en el ordenador, que asigna a cada uno una posición en bandejas especiales. Las botellas

que inicialmente tienen claros signos se separan y el resto se colocan en la posición marcada.

Las bandejas con las botellas se depositan en el módulo de lectura, que permanecerá cerrado durante todo el proceso y ésta es realizada por una cabeza móvil provista de dos agujas que perforan los tapones de goma. Cada botella es analizada por separado y es pinchada por dos agujas, una extrae el gas para examinar el nivel de CO₂ y la otra inyecta una mezcla de gases para mantener una atmósfera aerobia o anaerobia. El ambiente dentro del módulo de lectura se mantiene estéril con una lámpara de rayos ultravioleta y las agujas se esterilizarán después de cada extracción mediante el calor de una resistencia incandescente. Los primeros tres días se recomiendan dos lecturas diarias de las botellas aerobias para acortar el tiempo de positivización.^{68,71}

El ordenador almacena los resultados de la lectura diaria de los hemocultivos durante todos los días que permanecen en incubación. Cuando existe un índice de crecimiento superior a los niveles establecidos, el sistema informa a esa botella como positiva. Esta se recoge de la bandeja y se procesa mediante tinción de Gram y subcultivo. Existe un 2% de falsos positivos, en el que se encuentra un índice de crecimiento elevado y no se consigue aislar ningún microorganismo. Se ha atribuido a la actividad de las células hemáticas y se ha descrito en el caso de pacientes con leucemias agudas. Ante la persistencia de lecturas elevadas se debe descartar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento. Para ello se realizarán tinciones especiales y subcultivos a medios que permitan el aislamiento de dichos microorganismos.

La sensibilidad del sistema BACTEC es elevada y está claramente establecido que no es necesario realizar subcultivos o tinción de Gram durante las primeras 24 horas ni antes de desechar las botellas, tras 5 a 7 días de incubación. Ello supone ahorro de personal y disminución del riesgo de contaminación debida a la manipulación de las botellas. Además, permite consultar los resultados diariamente mientras dura la incubación. Este sistema se ha mejorado en una última versión en la que las bandejas son introducidas mecánicamente de forma automática en el módulo de lectura. Sus mayores inconvenientes son su elevado costo, las averías mecánicas y la limitación de la gestión de datos que no admite información externa sobre la identificación de los microorganismos y su sensibilidad a los antimicrobianos, lo cual lo convierte en algo completamente nulo para el análisis estadístico de los resultados.^{68,71,73,74}

Fig.8 Sistema de cultivo de sangre BACTEC NR 730 Laboratorio de Microbiología del Hospital Español 1993.



3.9.4.3 SISTEMA DE CULTIVO DE SANGRE FLUOROMÉTRICO

Es un método cuantitativo para el cultivo y aislamiento de microorganismos (bacterias y levaduras) en sangre. Basado en la detección del dióxido de carbono (CO_2) procedente del metabolismo microbiano.⁷⁵ Cuando los microorganismos están presentes, metabolizan los nutrientes del medio de cultivo, liberando dióxido de carbono al medio. Un sensor de fluorescencia presente en el fondo de cada botella de hemocultivo reacciona con el CO_2 intermitente. Este modula la cantidad de luz que es absorbida por el material fluorescente del sensor. Los fotodetectores del sistema miden el nivel de fluorescencia el cual corresponde con la cantidad de CO_2 liberado por los microorganismos.^{50,73,74,76} El voltaje de la corriente de lectura del diodo se compara con la lectura previa. Si el cambio de voltaje excede un valor delta

preestablecido, la microcomputadora marca la botella como positiva.

Para este fin se utiliza el sistema BACTEC de la serie fluorescente que consiste en un incubador autocontenido, agitador y artefacto de detección.⁶⁹ Hay tres tamaños (Figura 9), el modelo 9240 que sostiene 240 botellas, el modelo 9120 que sostiene 120 botellas y el modelo 9050 con capacidad de 50 botellas, hasta cinco módulos pueden conectarse a la misma unidad de control de la computadora.^{69,73}

Fig. 9 Equipos BACTEC modelo 9120, 9240 y 9050.⁷⁷

Modelo 9120



Modelo 9050



Modelo 9240

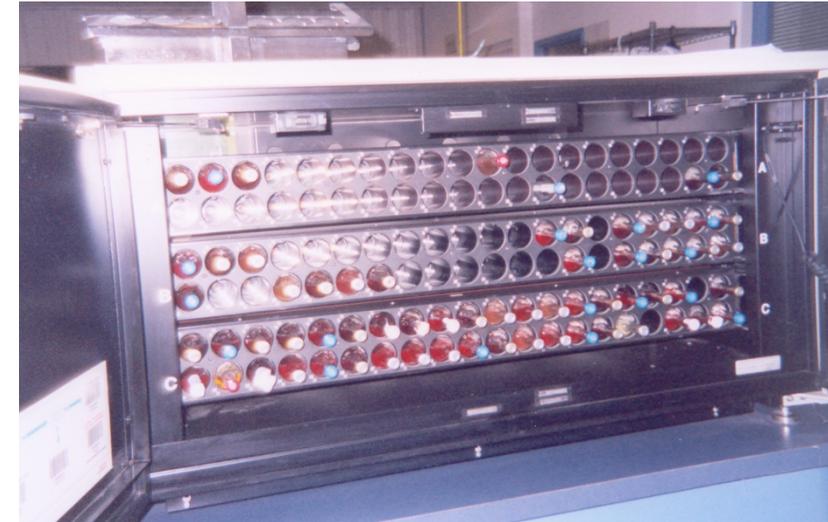


El sistema que se empleó para la realización de este trabajo es el sistema BACTEC 9120 que ha sido diseñado para la detección rápida de bacterias y hongos en muestras clínicas de hemocultivo extraídas directamente de los pacientes e inoculadas en las botellas de hemocultivo BACTEC, las botellas son introducidas en el sistema tan pronto como sea posible para asegurar un óptimo resultado.

Se considera que entre la colecta de la muestra y la llegada al laboratorio debe haber como máximo de tiempo dos horas debido a que una mayor demora puede dar resultados falsos negativos pues la bacteria puede alcanzar la fase logarítmica antes de incubarse.

El sistema BACTEC 9120 es capaz de monitorear un total de 120 botellas de hemocultivo BACTEC. La capacidad operativa es de 3 racks con 40 hemocultivos cada uno, con una duración de incubación de 5 a 7 días (Figura 10). Los racks llamados A, B y C, incluyen su control de temperatura a 35 °C, para favorecer el crecimiento de microorganismos y el instrumento conserva una temperatura interna a 30 °C. Las botellas son agitadas simultáneamente para conseguir la máxima recuperación de los microorganismos.^{50,69,74}

Fig.10 Equipo BACTEC 9120 con 3 racks 40 hemocultivos en cada uno Laboratorio Microbiología del Hospital Español.

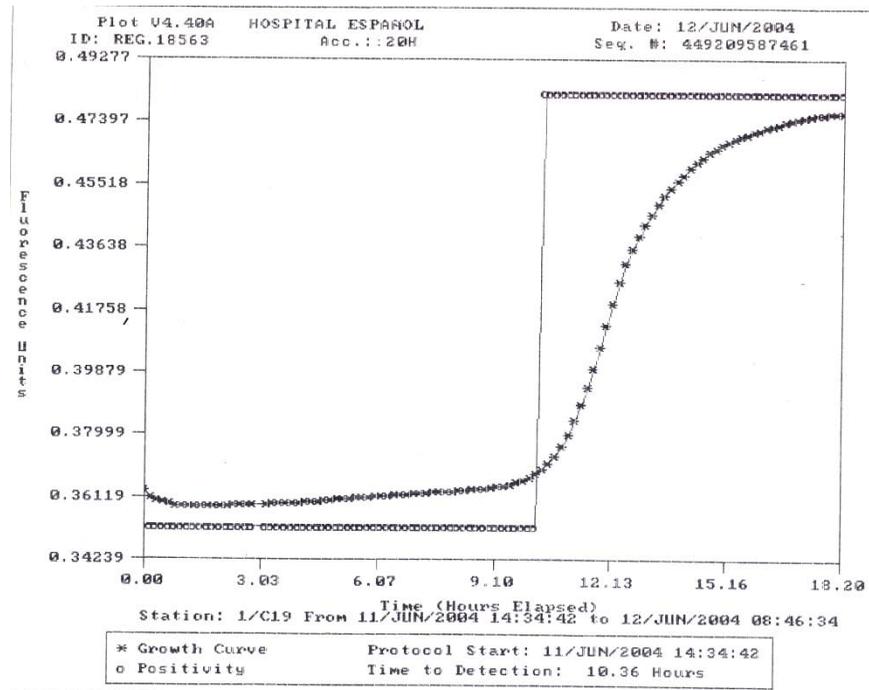


Cuando arranca el BACTEC 9120 el sistema realiza un autodiagnóstico y carga sus instrucciones de operación. Entonces el sistema comienza a monitorearse automáticamente. Una fila de Diodos Emisores de Luz (LEDs) se ilumina detrás de cada botella, activando los sensores fluorescentes de las botellas. A continuación los fotodetectores del sistema recogen las lecturas. El ciclo es completado cada diez minutos.⁶⁹

Los cultivos positivos son mostrados por una luz indicadora en el frontal del sistema, activándose una alarma sonora y mostrando un gráfico en la pantalla del monitor de la

computadora. En el eje de las abscisas se observa la curva de crecimiento bacteriano en su fase logarítmica y en el eje de las ordenadas las unidades de fluorescencia como se ve en la Gráfica 1.

Gráfica 1. Curva de crecimiento bacteriano en un hemocultivo positivo



BACTEC 9120 Laboratorio de Microbiología del Hospital Español.2004

Cuando aparece una botella positiva, el operador debe sacarla del sistema para la realización de una tinción de

Gram, para confirmar la presencia de microorganismos viables y realizar un subcultivo para el aislamiento e identificación del microorganismo.

3.9.4.3.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA BACTEC 9120

- El sistema es automático en su monitoreo.
- Da lecturas sin manipulación de los cultivos a través de la tecnología fluorescente no invasivo.
- Cuenta con una computadora para dar de alta las botellas asignándoles los datos de los pacientes.
- La computadora sirve de vínculo entre el instrumento y el usuario (Figura 11).
- Hay un mínimo manejo e intervención del usuario.
- Da aviso inmediato de las botellas positivas a través del indicador luminoso del instrumento.
- Cuenta con una alarma audible.
- Incuba y agita a todas las botellas BACTEC registradas al mismo tiempo.

Fig.11 Equipo BACTEC 9120 con computadora e impresora que registra las curvas logarítmicas de los hemocultivos positivos. Laboratorio de Microbiología del Hospital Español 2004.



3.9.4.3.2 CALIBRACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL INSTRUMENTO BACTEC 9120

Los componentes de los instrumentos de la serie fluorescente BACTEC se seleccionan y diseñan para mantener la integridad tanto óptica como eléctrica durante la vida útil del instrumento. Todos los instrumentos son calibrados en fábrica antes de su envío y no requieren ninguna calibración durante su vida útil, a menos que algunos componentes sean

reemplazados. La calibración ayuda a que cualquier serie de botellas fluorescentes en cualquier estación tendrán el mismo valor de fluorescencia inicial y final de un rango específico.

El software del sistema está diseñado para monitorear de manera continua el desempeño eléctrico y óptico de todas las estaciones simultáneamente. Esta función denominada BIT (Built-in Test ó Prueba integral), monitorea de manera automática cada estación en periodos de 10 minutos en cuanto a características operativas básicas. Estas pruebas continuamente verifican que la señal resultante de cada estación esté dentro de los límites del diseño. El intervalo de fluorescencia debe de mantenerse estable durante toda la vida del instrumento sin necesidad de que el usuario realice una calibración.

3.9.4.3.3 MANTENIMIENTO DIARIO

- ✓ Inspeccionar la temperatura de los racks A,B,C
- ✓ Revisar el funcionamiento de las lámparas
- ✓ Chequeo de la alarma audible
- ✓ Realizar respaldo de datos
- ✓ Hacer lectura de la temperatura interna debiendo ser $35^{\circ} \pm 1.5^{\circ} \text{C}$
- ✓ Verificar que la impresora tenga papel y funcione adecuadamente

3.9.4.3.4 MANTENIMIENTO PREVENTIVO

El mantenimiento preventivo (MP) es un elemento esencial para mantener el instrumento trabajando en óptimas condiciones y minimizar los tiempos muertos del mismo. Las fechas tentativas para desarrollar los mantenimientos preventivos del instrumento son a los tres y a los nueve meses posteriores a la fecha de instalación. Las actividades a realizar durante el mantenimiento preventivo incluyen:

- ✓ Inspección visual de todos los componentes del sistema
- ✓ Revisión de la tierra del sistema
- ✓ Verificación del suministro eléctrico al instrumento
- ✓ Verificación del control de temperatura
- ✓ Verificación de los voltajes de corriente directa del instrumento
- ✓ Revisión de elementos mecánicos

3.9.4.3.5 CARACTERÍSTICAS DEL MEDIO DE CULTIVO DE SANGRE BACTEC SERIE FLUORESCENTE

Ventajas:

- ✓ Las botellas con el medio de cultivo BACTEC tienen forma de botella de whisky, con su cuello largo y un espacio excesivo de cabeza; esto permite que la sangre sea extraída del paciente mediante un sistema Vacuntainer de recolección de sangre.⁶⁹

- ✓ No requieren venteo con aire atmosférico después de que se establece el cultivo de sangre, una ventaja señalada por los fabricantes por encima de la botella que debe ventearse.⁷⁸
- ✓ No necesita reconstitución, ni dilución, están listos para su empleo inmediato.
- ✓ Todos los medios BACTEC se suministran con bióxido de carbono (CO₂) añadido.
- ✓ Los medios anaerobios están prerreducidos y se suministran con CO₂ y nitrógeno (N₂). La composición puede modificarse de acuerdo con las necesidades específicas de rendimiento.
- ✓ Cada botella contiene un sensor químico que puede detectar aumentos de CO₂ producidos por el crecimiento de microorganismos. Un resultado positivo indica la presencia presunta de microorganismos viables dentro de la botella.^{69,74}
- ✓ A los medios de cultivo BACTEC se han incorporado resinas para contribuir al aislamiento de microorganismos en presencia de antibióticos, poniendo a su alcance un grado de recuperación mayor y un tiempo de detección más rápido.⁴⁶
- ✓ Las resinas forman un enlace con los antibióticos, disminuyendo así la concentración de los mismos en el medio. En cada botella de medio BACTEC están presentes dos tipos de resinas. Una es la resina fuertemente ácida de intercambio catiónico que forma un enlace iónico con los antibióticos cargados positivamente tales como los aminoglucósidos. El segundo tipo es una resina polímera, absorbente que forma enlaces con las partes hidrófobas de virtualmente cualquier clase de

antibiótico. Una vez que se ha creado un enlace molecular entre la resina y el antibiótico, el efecto de dicho antibiótico queda neutralizado. El proceso de neutralización reduce la actividad del antibiótico a un nivel que permite el crecimiento de microorganismos sensibles. En realidad lo que se pretende con una neutralización es incrementar el número de cultivos positivos.^{50,79}

- ✓ Las resinas también se encargan de lisar a los leucocitos donde por lo común, se encuentra una gran cantidad de bacterias que han sido fagocitadas aumentando el número de organismos viables en el medio de cultivo. Por lo anterior el medio de cultivo BACTEC es un medio lítico y esto contribuye a incrementar las probabilidades de éxito para aislar un microorganismo.^{50,77,80,81}

Desventajas:

- a. La detección de microorganismos se limita solo a los que son capaces de desarrollarse en este tipo de medio.
- b. Si se sospecha de bacteremias causadas por microorganismos que difícilmente se desarrollan en este medio por ejemplo: *Leptospira sp.* se deben usar medios suplementarios adicionales.
- c. Se pueden obtener resultados falsamente negativos cuando se encuentran presentes organismos cuya producción de CO₂ no es suficiente para que el sistema lo detecte o si hubo crecimiento apreciable antes de haberse colocado la botella al sistema.

- d. Puede haber resultados falsos positivos cuando en la muestra hay un recuento elevado de leucocitos.
- e. Los medios BACTEC tienen un alto costo.

3.9.4.3.6 COMPONENTES DE LAS BOTELLAS DE CULTIVO BACTEC SERIE FLUORESCENTE

Componentes	BACTEC PLUS Aerobic/F	BACTEC PLUS Anaerobic/F
Agua procesada	25 mL	25 mL
Caldo de digerido de soja-caseína	2,75% p/v	2,75% p/v
Extracto de levadura	0,25% p/v	0,4% p/v
Digerido de tejidos animales	—	0,05% p/v
Dextrosa	0,06% p/v	0,25% p/v
Sacarosa	0,084% p/v	—
Fructosa	—	0,25% p/v
Arginina	—	0,25 % p/v
Hemina	0,0005% p/v	0,0005% p/v
Menadiona	0,00005% p/v	0,00005% p/v
Piridoxal HCl (Vitamina B ₆)	0,001% p/v	—
Tioles	—	0,16% p/v
Citrato sódico	—	0,02% p/v
Fosfato potásico	—	0,24% p/v
Polianetolsulfonato sódico (PSS)	0,05% p/v	0,05% p/v
Resina adsorbente no iónica	16,0% p/v	16,0% p/v
Resina de intercambio catiónica	1,0% p/v	1,0% p/v

COMPONENTE DE BOTELLAS DE CULTIVO BACTEC PEDS PLUS CALDO DE DIGERIDO DE SOJA CASEÍNA CON RESINAS PARA USO PEDIÁTRICO

Componentes	.40 mL
Agua procesada	2.75% p/v
Caldo de digerido de soja-caseína	0.25% p/v
Extracto de levadura	0.10% p/v
Digerido de tejidos animales	0.10% p/v
Piruvato de sodio	0.06% p/v
Dextrosa	0.08% p/v
Sacarosa	0.0005% p/v
Hemina	0.00005% p/v
Menadiona	0.020% p/v
Potasioisulfonato sódico (SP5)	0.001% p/v
Piridoxal HCl (Vitamina B ₆)	10.0% p/v
Resina adsorbente no iónica	0.6% p/v
Resina de intercambio catiónico	

3.9.4.3.7 TIPOS DE BOTELLAS DE HEMOCULTIVO BACTEC

Existen diferentes tipos de botellas de hemocultivo las más utilizadas son:

- a) Las botellas de cultivo BACTEC tipo Plus Aeróbic/F (caldo enriquecido de digerido de soja-caseína con CO₂).
- b) Las botellas Plus Anaerobic/F (caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja-caseína con CO₂) para cultivos aerobios y anaerobios de muestras de adultos.
- c) Las botellas de cultivo BACTEC tipo PEDS PLUS/F (caldo enriquecido de digerido de soja-caseína con CO₂) para cultivos aerobios de pacientes pediátricos.

Además existen medios selectivos para hongos, levaduras y micobacterias, que pueden ser utilizados en casos específicos y todos ellos son compatibles con el sistema BACTEC 9120 (Figura 12).

Fig. 12 Diferentes tipos de botellas de hemocultivo BACTEC.
77



3.9.4.3.8 CONTROL DE CALIDAD DE LAS BOTELLAS DE CULTIVO BACTEC

- a) No utilizar ninguna botella de cultivo que muestre indicios de deterioro. Cualquier botella que presente

turbidez, contaminación, decoloración u oscurecimiento no debe usarse.

- b) Desechar las botellas de forma apropiada
- c) Incubar lo más rápido posible
- d) No utilizar botellas después de la fecha de caducidad
- e) Los medios de cultivo cuentan con un certificado de control de calidad el cual indica los organismos de prueba, incluyendo los cultivos de la American Type Culture Collection (ATCC) especificados en la Norma Quality Assurance for Commercially Prepared Culture Media (NCCLS).

Se recomienda analizar el rendimiento de cada lote de botellas recibidas utilizando un control positivo y negativo.

La botella (control positivo) se inocula con 1.0 mL de suspensión de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0.5 de McFarland. Esta botella junto con otra botella sin inocular (control negativo) se incuban y analizan en el instrumento. Dentro de 72 horas, el instrumento debe identificar la botella inoculada como positiva. La botella control negativo debe permanecer negativa. Esto verifica que los medios no se sometieron a condiciones perjudiciales de almacenamiento o transporte antes de su llegada al laboratorio.

Los siguientes aspectos deben tenerse en cuenta a la hora de decidir el sistema a utilizar para la lectura de las botellas de hemocultivos: ⁶⁸

- a. Sensibilidad y especificidad.
- b. Rapidez de la detección de crecimiento bacteriano.

- c. Volumen y composición de las botellas.
- d. Capacidad del sistema.
- e. Mantenimiento.
- f. Ahorro de personal.
- g. Costo del sistema.
- h. Flexibilidad en gestión de datos, versatilidad y sencillez del programa estadístico.

3.10 SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Existen métodos de susceptibilidad microbiana e identificación bacteriana. En las últimas tres décadas se han usado nuevos métodos de microbiología, por ejemplo en los 70s el método más usado fue por difusión de disco y pruebas bioquímicas en tubo. En los 80s se utilizaron métodos comerciales por dilución reportando la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los agentes antimicrobianos. ⁸²⁻⁸⁵

Existen diferentes métodos de identificación bacteriana en forma general se puede clasificar en:

- A) Métodos manuales
- B) Métodos semimanuales
- C) Métodos automatizados

3.10.1 MÉTODOS MANUALES

3.10.1.1 API 20

En la actualidad se dispone de cierto número de sistemas comerciales para la identificación de microorganismos que contienen reactivos estables y medios planeados para determinar características bioquímicas. Como las tiras de API 20 mostrando el método de inoculación y la apariencia de la tira luego de la inoculación y la incubación.

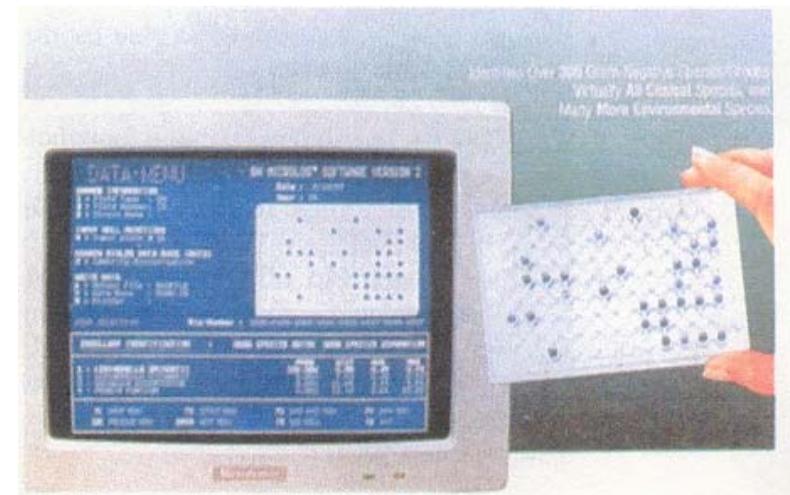
Se transfiere con una pipeta una suspensión del microorganismo a ensayar a cada una de los 20 compartimientos de medio. Las reacciones de color son leídas después de 18 a 24 horas de incubación a 35 °C. El fabricante entrega hojas de trabajo para registrar las interpretaciones visuales de las reacciones colorimétricas, que luego son convertidas en números biotípicos de siete dígitos.

3.10.2 MÉTODOS SEMIAUTOMATIZADOS

3.10.2.1 EL SISTEMA BIOLOG GN MICROPLATE

Consiste en microplacas de 96 pocillos que contienen 95 sustratos de carbono y un colorante de tetrazolio como indicador redox (Figura 13). Si un sustrato de carbono es utilizado por la bacteria inoculada, el colorante incoloro se reduce en forma irreversible y da un color púrpura. Con el uso de una pantalla de computadora, los pocillos púrpúreos se codifican como positivos y los incoloros como negativos. La computadora entonces compara la "huella digital metabólica" del microorganismo inoculado con la que está almacenada en una base de datos, y genera la identificación más probable.⁶⁹

Fig.13 El sistema BiologGN Microplate, consistente en microplacas de 96 pocillos⁶⁹



3.10.2.2 SISTEMA SCEPTOR SYSTEM BECTON DICKINSON

El sistema Sceptor es semiautomatizado y ha sido diseñado para identificar microorganismos grampositivos, gramnegativos y anaerobios. El sistema comprende un lector/registrador y un centro de manejo de datos. Los paneles de microdilución contienen sustratos bioquímicos desecados que son rehidratados durante la autoinoculación de una suspensión estandarizada del organismo en estudio. Luego de 18 a 20 horas de incubación fuera de línea a 35 – 37 °C, el panel de pruebas se coloca en el lector/registrador, que caracteriza una fuente de luz controlada para la interpretación del color de cada reacción. Las reacciones se comparan luego, con controles de color positivo y negativos. Los resultados se analizan en el centro de manejo de datos, que computa la identificación del organismo (Figura 14).

Fig.14 Sistema SceptorSystem Bectom. Laboratorio de Microbiología del Hospital Español 1993.

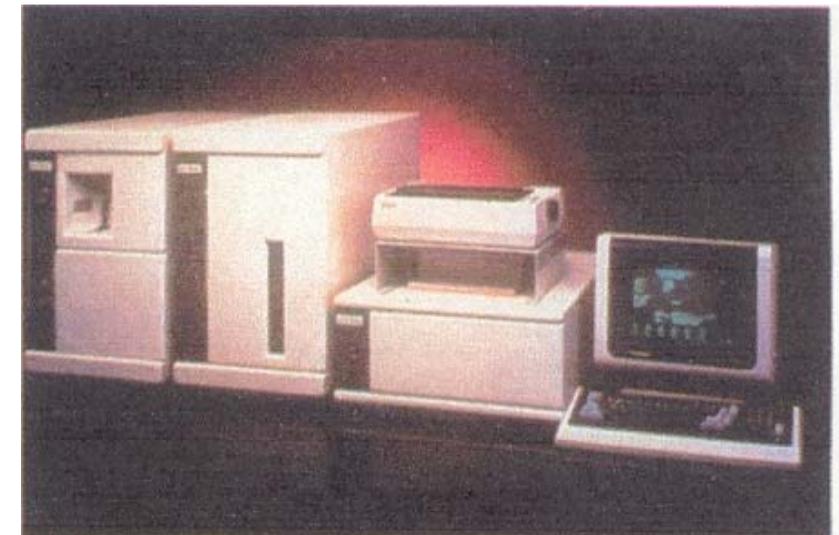


3.10.3 SISTEMAS AUTOMATIZADOS

3.10.3.1 SISTEMA VITEK

El sistema Vitek, consiste en un módulo generador de vacío lector-incubador, computadora-impresora y un monitor de computadora, (Figura 15). Este sistema es usado con tarjetas de ensayos Vitek para identificación bacteriana y pruebas de susceptibilidad a antibióticos totalmente automatizadas.^{73,74}

Fig. 15 Sistema Vitek, con lector incubador, computadora e impresora y un monitor de computadora⁶⁹



3.10.3.2 SISTEMA MICROSCAN WALKAWAY

Es el sistema utilizado en el presente trabajo para identificar el género y la especie de los microorganismos aislados. El sistema Walkaway es un sistema microbiológico totalmente automatizado que proporciona una alta velocidad de proceso, además de un alto porcentaje de confiabilidad de identificación, incuba, añade reactivos y determina los resultados de los paneles de forma automática. Para la obtención del antibiograma, se emplea la técnica de MIC que proporciona información de que antibiótico y a que concentración mínima se ve afectada o son sensibles los microorganismos aislados, y así proporcionar un indicio al médico para el tratamiento correcto de eliminación de las bacterias patógenas, (Figura 16).



3.10.3.2.1 EL EQUIPO MICROSCAN CONSTA DE:

- Micropipeta múltiple, la cual dosifica e inyecta en las placas de lectura el microorganismo a identificar.
- Módulo incubador / lector, el cual tiene la función de asegurar la lectura cada hora de las pruebas bioquímicas y antibiograma sin ninguna manipulación.
- Sistema de cómputo, que ejerce control y conexión entre los valores generados por el lector y los valores generados de antibiograma.
- Una terminal que permite dialogar con el sistema, personalizando los resultados y datos obtenidos.
- Impresora que permite la emisión de reportes y datos del sistema modular

Fig.16 Sistema Microscan WalkAway. Laboratorio del Hospital Español 2004.



El sistema Microscan Walkaway utiliza paneles deshidratados para la identificación del microorganismo a nivel de especie y la determinación de la MIC.

Los paneles más empleados son los paneles para bacilos aerobios y facultativos gramnegativos Combo N30 y para

cocos grampositivos Combo N12 y con menos frecuencia se utilizan paneles para identificación de anaerobios estrictos y microorganismos fastidiosos como *Haemophilus*.

Los paneles son placas que contienen diferentes sustratos liofilizados, también se utilizan pruebas convencionales modificadas y cromogénicas. La identificación se basa en la detección de cambios de pH después de 16 a 44 horas de incubación a 35 °C.

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos son una miniaturización de la prueba de sensibilidad a dilución, las cuales han sido deshidratadas. Varios agentes antimicrobianos son diluidos en caldo Muller- Hinton, con suplementos de calcio y magnesio adicionados a diferentes concentraciones de interés clínico. Después de inocular y rehidratar con suspensión estandarizada de microorganismos y de incubar a 35 °C por 16 horas, el sistema Microscan Walkaway se encarga de inocular reactivos y hacer diferentes lecturas de las pruebas bioquímicas así como de la sensibilidad, mostrando en el monitor el resultado del microorganismo aislado con un porcentaje de confiabilidad y la interpretación del MIC pudiendo mandar el resultado a todos los servicios del hospital por la red.

3.10.3.2 PRECAUCIONES EN EL USO DE PANELES

- a. Solo son para uso diagnóstico *in vitro*.
- b. Se debe tener condiciones asépticas y precauciones establecidas para evitar riesgos microbiológicos en todo el desarrollo del proceso ya que los paneles inoculados contienen organismos potencialmente patogénicos.
- c. Todos los materiales deben esterilizarse antes de ser desechados.

3.10.3.2.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS PANELES DESHIDRATADOS MICROSCAN

- A. Los paneles deben almacenarse de 2 a 30 °C. El almacenar en condiciones diferentes a las recomendadas, puede producir la pérdida de potencia de los agentes antimicrobianos y la decoloración de bioquímicos.
- B. Los paneles no se usan después de la fecha de expiración.
- C. No se usan los paneles si existe alguna de las siguientes condiciones:
 - a) Si no hay desecante o éste está roto
 - b) Si los pocillos del panel están descoloridos
 - c) Si la integridad del paquete está comprometida de alguna manera (sin sellar, agujereada o rota)
- D. La NCCLS recomienda revisar periódicamente las densidades inoculadas haciendo un recuento de colonias. Los resultados esperados deben encontrarse entre $3 \text{ a } 7 \times 10^5$ UFC/mL.

3.10.3.2.4 SISTEMA DE INOCULACIÓN PROMPT-D: PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD POR MICRODILUCIÓN

La suspensión estandarizada de microorganismos empleada en el estudio de sensibilidad a antimicrobianos por microdilución se realiza con el sistema de inoculación Prompt-D. Este método proporciona precisión y reproductividad en la determinación de la MIC.

El procedimiento de microdilución utilizado en los estudios de sensibilidad a antimicrobianos ha proporcionado resultados cuantitativos y se emplea para determinar la MIC de los agentes antimicrobianos. La precisión y la reproductividad del procedimiento dependen del uso de los materiales y los métodos establecidos. Un requisito importante del procedimiento para la determinación de la MIC es conseguir un inóculo bacteriano ajustado dentro de unos límites fijados, lo cual puede lograrse de dos formas:

- I. Mediante un ajuste manual del inóculo hasta alcanzar la turbidez estándar 0.5 de la escala de McFarland, seguido por la dilución apropiada.
- II. Mediante una incubación hasta la fase estacionaria del caldo de cultivo, seguida por la dilución apropiada.

El sistema de inoculación Prompt-D proporciona inóculos estandarizados, eliminando al mismo tiempo la necesidad de incubar y ajustar la turbidez. Los resultados obtenidos utilizando este sistema coinciden en al menos un 97% con los resultados obtenidos en estas mismas pruebas con inóculos

preparados siguiendo el procedimiento establecido por el NCCLS.

El sistema de inoculación Prompt-D consiste en una varilla de inoculación y una botella de líquido de dilución. La varilla es de polipropileno, lleva un anillo de seguridad que sirve para secarla, y va unida a un tapón. La punta de la varilla tiene una hendidura diseñada para contener un determinado número de bacterias, la varilla se pone en contacto con diversas colonias bacterianas en una placa primaria de aislamiento y se introduce en la botella de líquido de dilución.

La suspensión bacteriana permanece estable durante cuatro horas, dentro de este tiempo el 97% de las MIC están comprendidas dentro de un margen de dilución de ± 1 con respecto a las MIC establecidas mediante los métodos convencionales.

Este sistema facilita la preparación del inóculo de MIC al eliminar el período de incubación y la necesidad de ajustar la concentración del inóculo.

Hoy en día, la importancia de realizar un estudio retrospectivo de la frecuencia de bacteremias se puede resumir de la siguiente forma: ^{58,65}

- a) Obtener cifras confiables de bacteremias en tiempos determinados, ya sea días, semanas, meses o años, para utilizarlos como referencia acerca del funcionamiento adecuado de cada área del hospital, del

equipo de trabajo y del personal que labora dentro de este.

- b) Obtener un banco de datos estadísticos para realizar estudios epidemiológicos en periodos de tiempo, a corto, mediano y largo plazo.
- c) Conocer la frecuencia de bacteremias en las diferentes áreas del hospital, permitiendo predecir brotes y establecer políticas de uso de antibióticos y guías de control de acuerdo con la flora predominante para comparar entre una institución pública de salud y una privada.⁷⁸
- d) Finalmente, tratar de reducir esta última.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, las enfermedades provocadas por microorganismos afectan anualmente a millones de pacientes en el mundo provocando un elevado costo en su tratamiento. Se considera un problema crítico que afecta la calidad del cuidado de la salud, aún cuando la transición epidemiológica pone de manifiesto en nuestro país que los padecimientos y mortalidad por microorganismos ha disminuido considerablemente.

De estas enfermedades las bacteremias son de las más temidas por su alto grado de mortalidad; pudiéndose originar por diferentes vías tales como infecciones de vías urinarias, heridas quirúrgicas, neumonías, flebitis, gastroenteritis, etc., pudiendo ser de origen nosocomial o no, los microorganismos que las producen con más frecuencia son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus*, y algunos estafilococos coagulasa negativa, se conjugan además diversos factores de riesgo que en su mayoría pueden ser susceptibles de prevención y control; y varían dependiendo del sexo, edad, condición ambiental, instrumentos, personal médico e instalaciones hospitalarias.

Por tal razón se propone realizar un análisis retrospectivo en una institución privada de salud (Hospital Español) habiendo empleado el sistema BACTEC 9120 de la serie fluorescente para identificar las diferentes áreas donde se presentaron bacteremias y el tipo de microorganismos que se han encontrado en los últimos cinco años, esto con la finalidad de

comprobar si existe similitud con lo reportado por las instituciones públicas del sector salud en cuanto a frecuencia y porcentaje; y de esta forma tomar acciones preventivas para disminuir la mortalidad y morbilidad provocadas por este tipo de infecciones en beneficio tanto de los pacientes como del mismo hospital. Lo anterior es con la finalidad de poder establecer si en una institución privada, por el tipo de atención que se recibe, esta clase de problemas puedan presentarse con una frecuencia más baja, o bien las causas que los originan sean independientes de la atención y tipo de trato.

5. HIPÓTESIS

- a) Al emplear un sistema no convencional automatizado "BACTEC 9120 serie fluorescente", se tendrá mayor posibilidad de identificar a los microorganismos capaces de provocar una bacteremia de forma más rápida, precisa y oportuna que con el empleo de métodos convencionales y no convencionales no automatizados.
- b) Tomando en cuenta que las condiciones de infraestructura y atención médica no son las mismas en instituciones de salud pública y privadas, se espera que los porcentajes que se reportan en las primeras sean diferentes a los obtenidos en el presente estudio.

6. OBJETIVOS

- i. Identificar los principales microorganismos causantes de bacteremia en las diferentes áreas que conforman al Hospital Español.
- ii. Determinar si los porcentajes de microorganismos causantes de bacteremias que se encuentran en un hospital privado son similares ó diferentes a los reportados en instituciones del sector salud.
- iii. Determinar si existe dependencia entre los microorganismos más comúnmente presentes en una bacteremia y el área de localización.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

- ✓ Observacional
- ✓ Retrospectivo
- ✓ Transversal
- ✓ Descriptivo

❖ **Población de estudio:** pacientes del Hospital Español de los diferentes servicios y de todas las edades en los cuales se presentó bacteremia en los últimos cinco años.

❖ Variables

❖ Dependiente

- ✓ Presencia de bacteremia

❖ Independientes

- ✓ Sexo
- ✓ Edad
- ✓ Condición ambiental
- ✓ Instrumental médico-quirúrgico
- ✓ Personal médico
- ✓ Diversas áreas de hospitalización

❖ *Crterios*

De inclusión

- I. Pacientes con sospecha de bacteremias intermitentes en el momento del inicio del escalofrío o una hora antes del pico febril.
- II. Pacientes con sospecha de bacteremias continuas: endocarditis bacteriana, infecciones vasculares, pielonefritis, colangitis, fiebre tifoidea, etc. No importando el momento de toma.
- III. Pacientes con leucocitosis no explicable. Elevación de leucocitos polimorfonucleares.
- IV. Muestras de pacientes antes de iniciar la primera dosis de cualquier tratamiento antimicrobiano.
- V. Pacientes con fiebre de origen desconocido.

De exclusión

- i. Hemocultivos que no tuvieran el mínimo de sangre requerida.
- ii. Frascos mal etiquetados.

❖ ***Material***

- ✓ Botellas de cultivo BACTEC peds plus / F (caldo de digerido de soja – caseína con CO₂) de Becton Dickinson Company Sparks MD.
- ✓ Botellas de cultivo PLUS Aerobic / F (caldo enriquecido de digerido de soja- caseína con

CO₂ de Becton Dickinson Company Sparks MD.

- ✓ Botellas de cultivo PLUS Anaerobic / F (caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja - caseína con CO₂) de Becton Dickinson Company Sparks MD.
- ✓ Botellas de cultivo BACTEC LYTIC (10 Anaerobic / F) (caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja - caseína con CO₂) de Becton Dickinson Company Sparks MD.
- ✓ Botellas de cultivo BACTEC Mycol / F LYTIC de Becton Dickinson Company Sparks MD.
- ✓ Equipo de tinción para microscopia (Gram – color) Merck Germany.
- ✓ Equipo de tinción para microscopia (Ziehl Neelsen) Merck Germany.
- ✓ rompt Inoculation System –D Trademark of 3M Company, St. Paul MN USA.
- ✓ Agar chocolate BBL BD
- ✓ Agar gelosa sangre BBL BD
- ✓ Agar MacConkey BBL BD
- ✓ Agar sal y manitol BBL BD
- ✓ Agar biggy BBL BD
- ✓ Cloruro férrico 10%
- ✓ Reactivo de Kovac
- ✓ Hidróxido de potasio
- ✓ α-naftol al 5%
- ✓ Ácido sulfanílico
- ✓ N,N- dimetil α naftilamina
- ✓ Peptidasa

- ✓ Hidróxido de sodio al 0.85%
- ✓ Cloruro sódico
- ✓ Aceite mineral
- ✓ Reactivo de oxidasa (dihidrocloruro de tetrametil-p-feniléndiamina)
- ✓ Solución de turbidez estandarizada 0.5 McFarland de sulfato de bario
- ✓ Peróxido de hidrógeno

Equipo

- ✓ Automatizado BACTEC (9120 de la serie fluorescente) de Becton Dickinson Dade Behring. USA
- ✓ Automatizado MicroScan WalkAway 40 Baxter. USA
- ✓ Microscopio óptico. Axiostar Zeiss Germany
- ✓ Microscopio estereoscópico. Stemi SVG Zeiss Germany
- ✓ Estufa bacteriológica. USA
- ✓ Campana de flujo laminar. Telstar Bio II- A/P USA

❖ **Método**

Preparación del paciente

Desinfectar la piel en la zona a puncionar con gasa o algodón empapado con povidona yodada, dejando que actúe durante tres minutos, no limpiar con merthiolate.

- ✓ Colocarse guantes y limpiarse los dedos también con povidona.
- ✓ Dejar que el ayudante desenvuelva la jeringa o el adaptador de Vacutainer estéril y la presente al tomador de muestra sin tocar la aguja.
- ✓ Durante toda esta operación deberá haber un mínimo de personas en la habitación, idealmente

sólo el tomador de muestra y el ayudante; evitar las corrientes de aire, y no se debe hablar a menos que se tenga colocado el cubrebocas.

Toma de muestra

Antes de tomar la muestra se debe examinar cada botella para ver si se presentan indicios de contaminación, por ejemplo; turbidez, un tapón hinchado, fugas NO SE DEBE USAR cualquier botella que presente indicios de contaminación en la recogida directa, los gases o los medios de cultivo contaminados podrían refluirse a la vena del paciente. Es posible que la contaminación de una botella no se vea fácilmente. Si se usa un procedimiento de recogida directa, se debe controlar el proceso cuidadosamente para evitar que el líquido se refluya a la vena del paciente.

Para la recolección de la muestra, normalmente se utiliza una jeringa con punta LUER-LOK de 10 cc o 20 cc. Si es necesario, se puede utilizar un juego de soporte de aguja Vacutainer y un juego de recolección de sangre Vacutainer, que incluya un recolector tipo “mariposa”. Se observa cuidadosamente la dirección de flujo de la sangre al empezar la colecta de la muestra. El vacío en la botella normalmente excede los 10 mL, de forma que se debe vigilar el volumen extraído mediante las marcas graduadas de 5 mL, en la etiqueta de la botella.

Una vez extraídos los 8 a 10 mL deseados, se debe detener el flujo poniendo una pinza en el tubo y quitando el juego de aguja y tubo de la botella BACTEC (Figura 17. agujas,

frascos y equipo de recolección de muestras). Al terminar la extracción presionar la vena inmediatamente después de haber retirado la aguja, nunca presionar mientras esta se retira pues el contacto del algodón con la aguja puede contaminar la muestra.

Fig.17 Equipo de recolección de muestras⁷⁷



❖ **Inoculación e incubación de las muestras de hemocultivo**

- ✓ Se desprende el tapón a presión de la botella BACTEC e inspecciona la botella para ver si hay roturas, contaminación, turbidez excesiva o tapones hinchados o dañados. No utilizar si se observa cualquier defecto antes de inocular, limpiar la membrana con alcohol (no se recomienda yodo). Inyectar asépticamente o extraer directamente de 8 a 10 mL de la muestra por cada botella. En botellas pediátricas se inoculan de 1 a 3 mL de sangre. Si se utilizan muestras con volúmenes de 3 a 7 mL, el aislamiento será inferior al que se obtiene con volúmenes mayores.⁷⁷
- ✓ Sacudir suavemente las botellas, rotularlas siempre con los datos completos del paciente, incluyendo la hora de la toma, y remitirlos al laboratorio a la brevedad posible.
- ✓ Los formatos de petición al laboratorio deben especificar el diagnóstico o el probable diagnóstico del paciente, hacer constar también si la muestra se tomó a través de catéter.
- ✓ Las botellas inoculadas de aerobios y anaerobios deben ponerse en el instrumento BACTEC de la serie fluorimétrica tan pronto como sea posible para la incubación y verificación. Si esta acción se retarda es posible observar crecimiento a simple vista, la botella no debe analizarse en el instrumento BACTEC de la serie fluorimétrica sino que debe subcultivarse, teñirse mediante el método

de Gram y considerarse como una botella presuntamente positiva.

- ✓ Las botellas que se ponen en el instrumento serán analizados automáticamente cada diez minutos durante el periodo de protocolo de cinco días, y si se sospecha de microorganismos de lento crecimiento se da un protocolo de 21 días. El instrumento BACTEC de la serie fluorimétrica determina cuáles botellas son positivas y las identifica. No se ve una diferencia obvia en el sensor dentro de la botella en el caso de botellas positivas y negativas. Sin embargo, el instrumento BACTEC de la serie fluorimétrica detecta una diferencia en la fluorescencia.

- ✓ Si al final del periodo de análisis una botella negativa parece positiva a simple vista (esto es, con sangre «chocolatizada», una membrana hinchada, sangre lisada y/o muy oscurecida), la botella debe subcultivarse, teñirse mediante el método de Gram y considerarse como una botella presuntamente positiva.

❖ **Realización de subcultivo en muestras detectadas como positivas**

- ✓ Antes de realizar el subcultivo, se pone la botella en posición vertical y se coloca un trozo de algodón empapado en alcohol sobre la membrana, se introduce una aguja estéril con un filtro o tapón adecuado a través del trozo de algodón empapado en alcohol y la membrana con el fin de eliminar la presión en la botella. La aguja se retira después de haber descendido la presión y antes de tomar una muestra de la botella para efectuar un subcultivo, etc. La inserción y retirada de la aguja debe realizarse moviendo la mano en línea recta, evitando movimientos giratorios. Unas gotas de la muestra se utilizan para realizar una tinción de Gram; esto con dos finalidades:

- a) verificar que haya microorganismos viables en la muestra
- b) seleccionar los medios de cultivo dependiendo del tipo de microorganismo observado

Para lograr un aislamiento óptimo de microorganismos, los cultivos negativos pueden verificarse mediante teñido y/o subcultivo en cualquier momento antes de desecharse como negativo.

- ✓ Los microorganismos gramnegativos se subcultivan en agar gelosa sangre, agar gelosa

chocolate si se sospecha de bacteremias causadas por *Haemophilus sp* o *Neisseria sp* y agar MacConkey.

- ✓ Los microorganismos grampositivos se subcultivan en agar gelosa sangre y agar sal y manitol.
- ✓ Las placas se incuban a 37 °C por 24 horas; los agares sangre y chocolate se incuban a presión reducida utilizando la técnica anaerocult C.
- ✓ La técnica de anaerocult C. Se realiza como lo muestran las siguientes figuras:

Fig. 18 Agitar levemente las bolsas anaerocult sostenidas con la mano abierta y humedecer uniformemente el lado impreso de la bolsa con 6mL de agua.

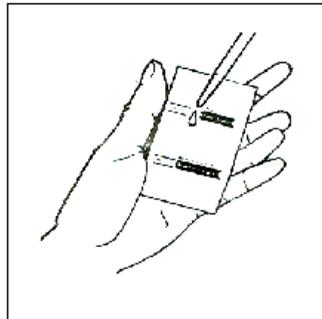


Fig. 19 Inmediatamente después, colocar la bolsa anaerocult C perpendicularmente dentro de la jarra Gas Pack.

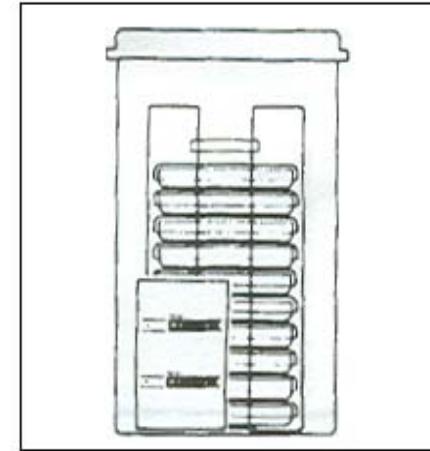
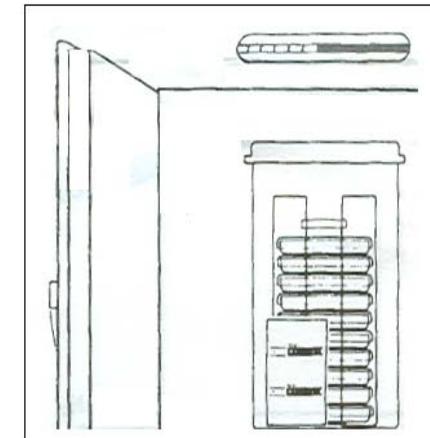


Fig. 20 Cerrar la jarra herméticamente e introducirla en la estufa a 35 °C de 18 a 24 horas.



❖ **Diferenciación e identificación de los microorganismos obtenidos**

Una vez obtenidas los microorganismos se realizan reacciones bioquímicas rápidas:

➤ Para cocos grampositivos:

Catalasa: agregar una colonia aislada a una gota de H_2O_2 , previamente colocado en un porta objetos para verificar entre catalasa positiva y catalasa negativa para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*.

Coagulasa: en un tubo de ensayo se coloca 0.5 mL de plasma diluido y una asada de bacterias, mezclar por rotación suave, colocar el tubo a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas y observar la formación de fibrina.

➤ Para bacilos gramnegativos:

Oxidasa: consiste en determinar la presencia de la enzima oxidasa; y se realiza de la siguiente manera:

Fig. 21 Con el asa de inoculación tomar del medio de cultivo una colonia aislada, que haya crecido bien.

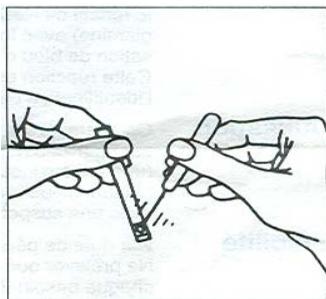
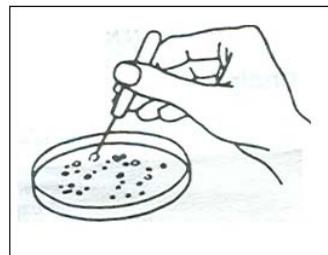


Fig. 22 Aplicar la colonia sobre la zona reactiva y frotar con el asa de inoculación.

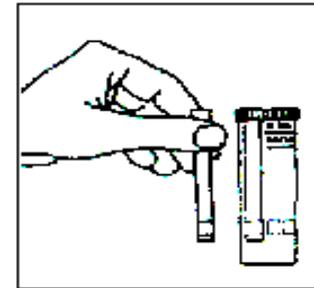
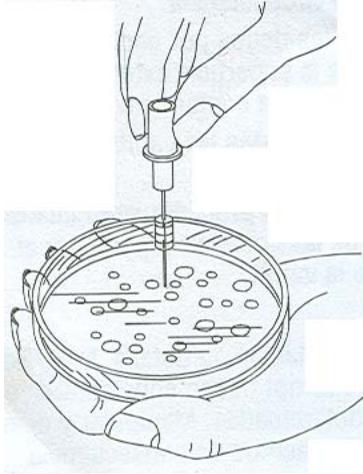


Fig. 23 Al cabo de aprox. 20 a 60 segundos comparar con la escala colorimétrica.

Se procede a identificar al microorganismo aislado empleando el sistema Lab. Pro™ WalkAway 40/96. La preparación de la suspensión bacteriana generalmente se realiza con el sistema de inoculación Prompt.

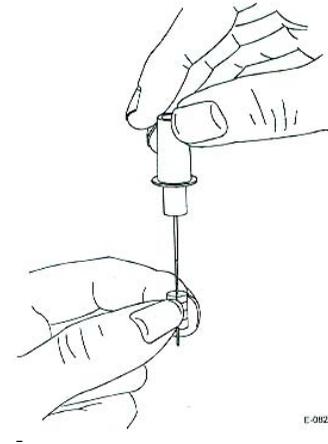
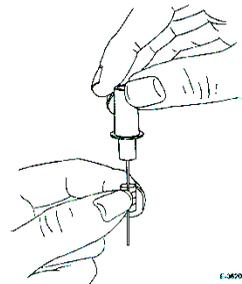
Preparación de la suspensión bacteriana



- a. Utilizar una varilla de inoculación para tomar la colonia.
- b. Mantener la punta de la varilla perpendicular a la superficie del agar y tocar con ella 3 colonias aisladas cuyo tamaño sea al menos tan grande como la punta de la varilla. No perforar el agar. No raspar ni arrastrar el extremo de la varilla por las colonias. (Fig. 24)

NOTA: En el caso de colonias muy pequeñas, casi milimétricas, continuar incubando la placa primaria hasta que alcancen el diámetro de la punta de la varilla. Si resulta improbable que el diámetro de la colonia alcance dicho tamaño (por ejemplo, en el caso de determinados estreptococos), se emplea otro método de preparación de inóculos

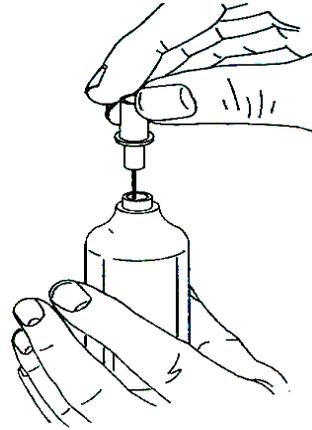
- c. Sosteniendo la varilla por el tapón con una mano, sujetar la anilla con la otra y tirar con firmeza para romper la unión entre la anilla y el vástago de la varilla. No retorcer ni doblar la anilla. Mantener el extremo de la varilla apuntando al suelo. (Fig. 25)



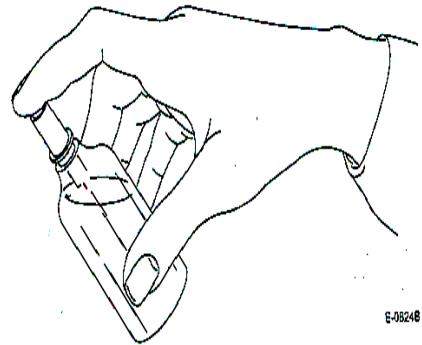
- d. Tirar de la anilla lentamente hacia abajo, separarla del vástago de la varilla y desecharla. (Fig. 26)
- e. Sujetando la varilla de inoculación con una mano, coger una botella de inoculación de Prompt.



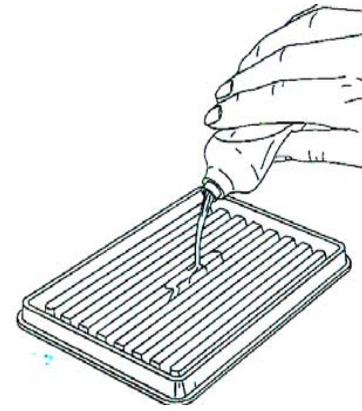
- f. Doblar el cierre de la botella hacia un lado hasta que éste se parta. (Fig. 27).



g. Introducir la varilla de inoculación dentro de la botella y presionar hacia abajo con un movimiento giratorio para asegurarse de que quede bien cerrado. (Fig. 28)



h. Agitar bien la botella durante 8 ó 10 minutos para que las bacterias se desprendan del extremo de la varilla. Si no se desprenden, dejar reposar la solución durante 5 minutos y agitar de nuevo. (Fig. 29)



i. La suspensión bacteriana debe emplearse dentro de un plazo de cuatro horas después de su preparación. Si no se utiliza inmediatamente después de su preparación, se deberá agitar bien antes de usar, con el fin de resuspender las bacterias.(Fig. 30).

❖ **Colocación de la suspensión en el inoculador**

- Sacar la varilla de inoculación de la botella y desecharla.
- Verter la suspensión en el inoculador, apretando suavemente la botella.(Fig. 30)
- Proceder a inocular a los paneles el MIC mediante un procedimiento de microdilución apropiado.

Limitaciones:

- a) El Sistema de Inoculación Prompt-D no debe emplearse cuando el tamaño de la colonia sea inferior al de la punta de la varilla. Entre los

organismos que no pueden alcanzar ese tamaño se encuentran los *Streptococcus sp.* A excepción del *S. bovis* y el *S. agalactiae* (Grupo B). Si se utilizan colonias demasiado pequeñas, la inoculación será inferior a la normal y esto puede hacer que un organismo resistente parezca sensible. En el caso de colonias con un tamaño inferior al de la punta de la varilla, deberá emplearse otro método de preparación de inóculos.

- b) Es posible que algunas colonias mucoides, como las de *Klebsiella sp* o *Pseudomonas sp*, no se adhieran a la varilla al picar la colonia. Esto podrá verse claramente. En el caso de este tipo de microorganismos, deberá emplearse otro método de preparación de inóculos.

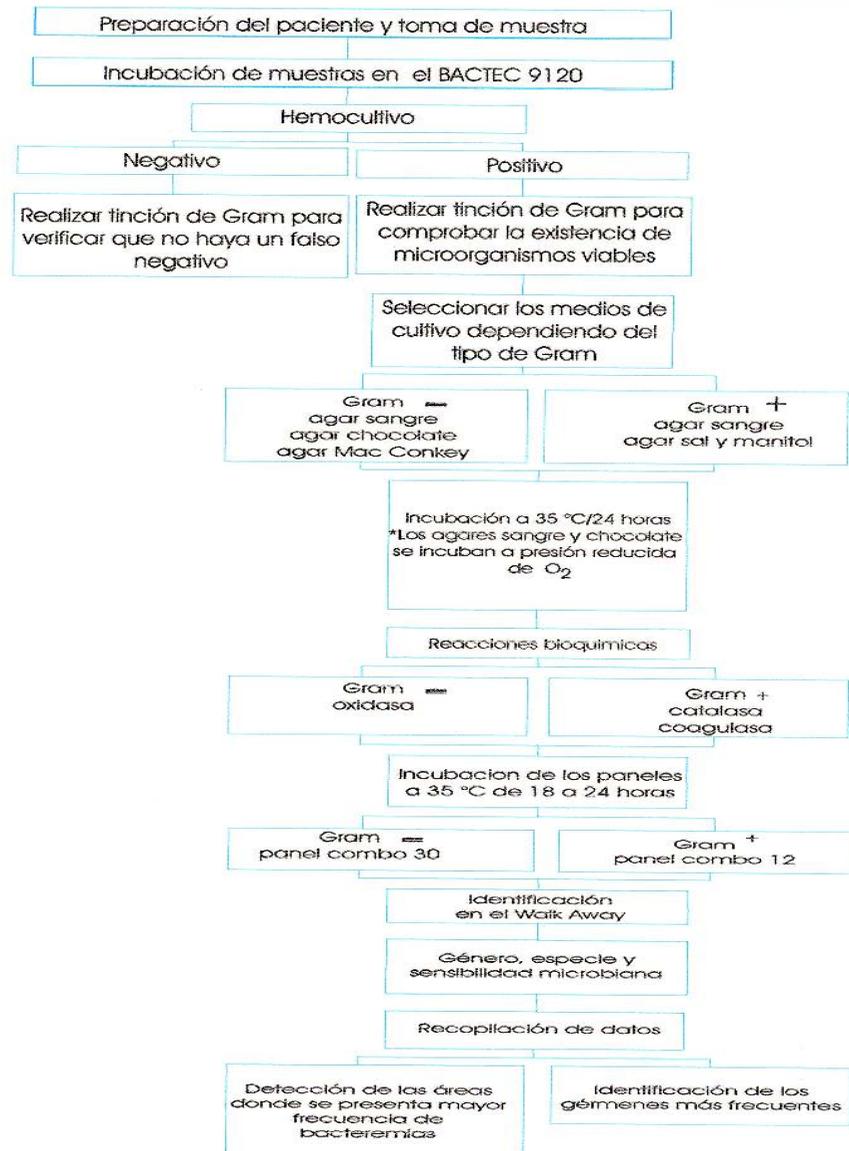
La suspensión bacteriana se inoculara en los paneles: panel Combo 12 para microorganismos grampositivos, panel Combo 30 para bacilos gramnegativos, o se pueden emplear paneles de identificación rápida como paneles para anaerobios, levaduras y *Haemophylus*

Los paneles inoculados se incuban en el sistema Lab Pro™ WalkAway 40/96. Se obtienen así los resultados de la identificación de forma totalmente automatizada a partir de las 4 horas de incubación si son paneles rápidos ó18 a 24 horas en paneles normales.

La identificación de los agentes causales de bacteremias se hacen a nivel de género y especie así como la sensibilidad antimicrobiana, si es necesario se utilizan diferentes antisueros para identificar el grupo, según sea el caso.

Realizar el análisis estadístico de los resultados identificando los agentes causales de bacteremias y las áreas hospitalarias en donde se detectan.

DIAGRAMA DE FLUJO



8. DISEÑO ESTADÍSTICO

El tratamiento de los resultados obtenidos se llevó a cabo empleando procedimientos descriptivos de estadística:

- Gráficos
- Tablas de frecuencia y/o porcentajes
- Utilización X^2

9. RESULTADOS

El total de hemocultivos realizados en el período comprendido entre los años 2000 a 2004 fue de 10,885 de estos resultaron positivos 1,028 lo cual representa un 9.44% del total.

Tabla 1 Relación de hemocultivos negativos y positivos en un periodo de 5 años.

Años	Total de hemocultivos	No. de hemocultivos negativos	No. de hemocultivos positivos	% Negativos	% Bacteremias
2000	2124	1931	193	90.92 %	9.08 %
2001	2111	1919	192	90.91 %	9.09 %
2002	2300	2103	197	91.44 %	8.56 %
2003	2200	1993	207	90.6 %	9.40 %
2004	2150	1911	239	88.89 %	11.11 %
Total	10,885	9, 857	1, 028	90.55 %	9.44 %

El año con mayor cantidad de hemocultivos realizados pero también con la mayor cantidad de resultados negativos fue el 2002. Por otro lado el año donde se presentaron mayor cantidad de bacteremias tanto en número como en porcentaje fue el de 2004 (Tabla 1)

En la grafica 2 se observa la relación de microorganismos aislados de hemocultivos en 5 años y sus porcentajes, donde se observa predominio de los bacilos gramnegativos, destacando de manera importante la cantidad de levaduras la cual es cercana al 10%.



Tabla 2 Relación de cocos **grampositivos** aisladas en hemocultivos en el período 2000 - 2004

Bacterias aisladas	Frecuencia	Porcentaje
<i>E. durans / hirae</i>	1	0.23 %
<i>E. faecalis</i>	30	6.9 %
<i>E. faecium</i>	13	3.0 %
<i>E. gallinarum</i>	1	0.23 %
<i>Leuconostoc sp.</i>	1	0.23 %
<i>Streptococcus</i> grupo C	1	0.23 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	0.93 %
<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	12	2.78 %
<i>Streptococcus</i> α -hemolítico	44	10.2 %
<i>S. aureus</i>	77	17.86 %
<i>S. epidermidis</i>	209	48.49 %
<i>S. haemolyticus</i>	10	2.3 %
<i>S. hominis h</i>	33	7.6 %
<i>S. saprophyticus</i>	3	0.69 %
<i>S. auricularis</i>	2	0.46 %
<i>S. bovis</i>	4	0.93 %
<i>S. cohnii</i>	1	0.23 %
<i>S. cohnii – cohni</i>	1	0.23 %
<i>S. pyogenes</i>	1	0.23 %
<i>S. hominis – novo</i>	6	1.39 %
<i>Micrococcus</i>	1	0.23 %

En la tabla 2 se enlistan el total de cocos grampositivos con género y especie especificando la frecuencia y el porcentaje de cada una en un período de 5 años.

Tabla 3 Relación porcentual de cocos **grampositivos** por género aisladas de hemocultivos en el período 2000–20004.

Bacterias aisladas	Frecuencia	Porcentaje
<i>Staphylococcus</i>		
<i>S. aureus</i>	77	17.86 %
<i>S. epidermidis</i>	209	48.49 %
<i>S. haemolyticus</i>	10	2.3 %
<i>S. hominis</i>	33	7.6 %
<i>S. saprophyticus</i>	3	0.69 %
<i>Streptococcus</i>		
<i>Streptococcus</i> β hemolítico	12	2.78 %
<i>Streptococcus</i> α -hemolítico	44	10.2 %
<i>E. faecalis</i>	30	6.9 %
<i>E. faecium</i>	13	3.0 %
Total	431	100 %

La tabla 3 muestra los cocos grampositivos más frecuentemente encontrados por género y especie, donde destaca el *S. epidermidis* con un amplio predominio sobre los demás cocos encontrados.

Tabla 4 Relación de bacilos aerobios y facultativos **gramnegativos** aisladas en hemocultivos en el período 2000 – 2004.

Bacterias aisladas	Frecuencia	Porcentaje
<i>Enterobacter</i>		
<i>E. agglomerans</i>	6	1.24 %
<i>E. cloacae</i>	37	7.69 %
<i>E. aerogenes</i>	29	6.02 %
<i>Klebsiella</i>		
<i>K. oxytoca</i>	22	4.57 %
<i>K. pneumoniae</i>	38	7.90 %
<i>Citrobacter</i>		
<i>C. freundii</i>	13	2.7 %
<i>Morganella</i>		
<i>M. morganii</i>	5	1.03 %
<i>Proteus</i>		
<i>P. mirabilis</i>	7	1.45 %
<i>Escherichia</i>		
<i>E. coli</i>	146	30.35 %
<i>Salmonella</i>		
<i>S. typhi</i>	6	1.24 %
<i>S. enterica</i>	3	0.62 %
<i>S. cholerae suis</i>	7	1.45 %
<i>Serratia</i>		
<i>S. marcescens</i>	15	3.11 %
<i>Acinetobacter</i>		
<i>Ac. baumannii</i>	15	3.11 %
<i>Ac. Iwoffii</i>	23	4.78 %
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. aeruginosa</i>	85	17.67 %
<i>Stenotrophomonas</i>		
<i>S. maltophilia</i>	22	4.57 %
<i>Burkholderia</i>		
<i>B. cepacia</i>	2	0.41 %
Total	481	100 %

La tabla 4 enlista el total de bacterias gramnegativas especificando el número de aislamientos en un período de cinco años, así como el porcentaje de cada una considerando el número total de aislamientos. Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *E. coli* con 30.35%, *P. aeruginosa* con un 17.67%, *K. pneumoniae* con 7.90% y *Enterobacter cloacae* con un 7.69%.

Tabla 5 Relación porcentual de bacilos aerobios y facultativos **gramnegativos** aisladas en hemocultivos

Bacterias aisladas	Frecuencia	Porcentaje
<i>Enterobacter</i>	72	14.96 %
<i>Klebsiella</i>	60	12.47 %
<i>Escherichia</i>	146	30.35 %
<i>Acinetobacter</i>	38	7.9 %
<i>Pseudomonas</i>	85	17.67 %

En la tabla 5 se muestra a los géneros más frecuentemente aislados de bacilos gramnegativos donde al igual que en la tabla anterior predominan *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* además de *Klebsiella*.

Tabla 6 Relación de enterobacterias aisladas en hemocultivos

Enterobacterias	Frecuencia	Porcentaje
<i>Enterobacter</i>	72	21.55 %
<i>Klebsiella</i>	60	17.96 %
<i>Citrobacter</i>	13	3.89 %
<i>Morganella</i>	5	1.49 %
<i>Proteus</i>	7	2.09 %
<i>Escherichia</i>	146	43.71 %
<i>Salmonella</i>	16	4.79 %
<i>Serratia</i>	15	4.49 %
Total	334	100 %

La tabla 6 se presenta la relación de las enterobacterias aisladas en los hemocultivos en 5 años con un total de 334 aislamientos. Siendo las de mayor frecuencia *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Tabla 7 Relación de bacilos gramnegativos no fermentadores aisladas en 5 años.

No fermentadores	Frecuencia	Porcentaje
<i>Acinetobacter</i>	38	25.85 %
<i>Pseudomonas</i>	85	57.82
<i>Stenotrophomonas</i>	22	14.96 %
<i>Burkholderia</i>	2	1.36 %
Total	147	100%

En la tabla 7 se observa la relación de bacilos gramnegativos no fermentadores aislados con un total de 147 aislamientos.

Tabla 8 Relación de bacterias anaerobias obligadas aisladas en hemocultivos.

Anaerobios	Frecuencia	Porcentaje
<i>Bacteroides fragilis</i>	12	57.14 %
<i>Bacteroides ovatus</i>	7	33.33 %
<i>B. thetaiotaomicron</i>	2	9.52 %
Total	21	100 %

La tabla 8 muestra la relación de bacterias anaerobias obligadas aisladas en hemocultivos siendo el *B. fragilis* el microorganismo con mayor frecuencia dentro de los anaerobios obligados.

Tabla 9 Relación porcentual de levaduras aisladas.

Levaduras	Frecuencia	Porcentaje
<i>Candida albicans</i>	52	68 %
<i>Candida sp.</i>	43	32 %
Total	95	100%

En la tabla 9 se observa la relación porcentual de levaduras aisladas con un total de 95 lo cual representa una cantidad considerable.

Tabla 10 Relación de microorganismos más comunes aislados en el Hospital Español en 5 años

Bacteria aislada	Frecuencia	Porcentaje
<i>S. epidermidis</i>	209	20.33 %
<i>E. coli</i>	146	14.2 %
<i>P. aeruginosa</i>	85	8.26 %
<i>S. aureus</i>	77	7.49 %
<i>Candida albicans</i>	52	5.05 %

La tabla 10 muestra los 5 microorganismos más comúnmente encontrados en el período que abarcó el estudio. Se observa un mayor porcentaje de grampositivos con respecto a los gramnegativos, destacando entre ellos la presencia de *Candida albicans* y *Candida* sp. Las cuales abarcan un porcentaje considerable del total tomando en cuenta que las fungemias no son reportadas comúnmente ya sea por omisión si el número es muy bajo o porque no se cuente con lo necesario para su detección.

A partir de los microorganismos más frecuentemente encontrados como causantes de bacteremias, tomando en cuenta algunas de las variables independientes establecidas y asumiendo que un hospital de tercer nivel cuenta con diversas áreas se planteó la propuesta de establecer si los mismos tienen alguna relación con el sitio en el cual fueron aislados y así realizar el análisis estadístico para asumir si existe independencia entre los sitios de aislamiento y el microorganismo identificado en cada uno de ellos.

De acuerdo al estado de salud en que se encontraban los pacientes se establecieron las áreas de la siguiente manera:

UTI : Unidad de Terapia Intensiva

PO₆ : (piso 6) Terapia Intermedia

PO₃, PO₄, PO₅: (pisos 3-5) Admisión General ó Estancia Hospitalaria en General.

La prueba estadística implicada para determinar independencia entre variables es χ^2 y se realiza armando tablas de contingencia dependiendo de los “n” renglones y “n” columnas que se puedan construir. En este caso se elaboró y quedó tal y como es presentada a continuación:

Sección	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. Epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	Total
UTI	30	42	53	15	29	169
PO ₆	60	14	29	25	5	133
Adm. Gral.	40	9	28	17	7	101
Total	130	65	110	57	41	403

Para tal efecto se plantearon las siguientes hipótesis a probar:

Ho: El microorganismo encontrado es independiente de la sección.

Ha: El microorganismo encontrado no es independiente de la sección

10. DISCUSIÓN

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

$\chi^2_{0.05, 8} = 15.507$ (valor tomado de tablas con el nivel de significancia ya mencionado y 8 grados de libertad).

El resultado obtenido para el análisis fue:

$\chi^2 = 56.6$

Se rechaza H_0 , por lo tanto el microorganismo encontrado no es independiente del lugar de origen

México como otros países en vías de desarrollo tiene un sistema de atención de salud heterogéneo, si bien se distingue por disponer de grandes instituciones dedicadas a la atención médica de gran parte de la población estas denominadas en conjunto Sector Salud, su infraestructura y economía muchas de las veces es limitada reflejándolo en un funcionamiento poco eficiente en términos de calidad de atención médica donde cuyos resultados son entre otros una tasa elevada de infecciones adquiridas dentro de las mismas.^{46,79}

El factor económico no es lo único que interviene en las elevadas frecuencias de infecciones nosocomiales, falta también un nivel mínimo de organización que regule el funcionamiento de los hospitales de acuerdo a estándares mínimos de calidad.⁴⁶

Por otra parte están los hospitales privados, algunos de tercer nivel que cuentan con una gran infraestructura e invierten recursos para mejorar sus servicios tratando de cumplir con los estándares de calidad establecidos para poder ser certificados de acuerdo a las diferentes normas ISO (Organización Internacional de Estándares).

Es importante mencionar la diferencia entre las instituciones hospitalarias públicas y privadas ya que los resultados obtenidos en el presente estudio dependieron en gran parte de ello. Es así que se puede decir que el Hospital Español, donde se realizó este estudio, es un hospital privado, de tercer nivel que cuenta con un laboratorio de microbiología con la

capacidad de proporcionar resultados que cumplen con los controles de calidad establecidos por el Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico (NCCLS).⁶²

En el hospital se lleva un control epidemiológico constante por el personal que conforma el Comité de Control de Infecciones Hospitalarias.

Se atiende a pacientes de cualquier especialidad, de diferentes nacionalidades con hábitos y costumbres diferentes entre sí, la mayoría de situación socioeconómica elevada siendo esta la población de estudio.

De ahí podría pensarse que la frecuencia de infecciones nosocomiales no es muy alta, pero en realidad no se tiene un parámetro real de medición ya que los estudios publicados hasta la fecha son exclusivamente de instituciones gubernamentales que reflejan lo que ocurre solo en el sector salud por lo que no se puede hablar de forma comparativa.⁷⁹

Esta situación es muy diferente en países desarrollados, en donde se colecta información de múltiples hospitales empleando protocolos específicos para pacientes con riesgos similares de infección.⁶²

Varios autores mencionan que en los últimos años las bacteremias por cocos grampositivos igualan o superan a las ocasionadas por bacilos gramnegativos.^{44,86} Martínez Aguilar y cols.⁶² reportan el 61.1% provocadas por cocos grampositivos y un 38.88% por bacilos gramnegativos. Por otra parte Astagneau⁵⁶ reporta un 33% por grampositivos y

un 53% por gramnegativos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de los mencionados con anterioridad pues se encontró que un 41.92% de bacteremias son causadas por microorganismos grampositivos y un 46.78% por gramnegativos, también se encontraron bacteremias por anaerobios obligados en un 2.04%. Estos microorganismos se aislaron en las diferentes áreas hospitalarias con una distribución como lo muestra la Gráfica No 1.

A pesar de la diferencia en las proporciones de grampositivos y gramnegativos en las distintas estadísticas lo cierto es que los cocos grampositivos se han incrementado considerablemente en las últimas décadas en México y en todo el mundo; específicamente los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN).⁸⁶

En un estudio realizado en pacientes pediátricos, se analizaron 1129 catéteres intravasculares y se encontró que la mitad de las bacteremias se asocian a *Staphylococcus coagulasa negativa*, confirmándose que la colocación de catéteres intravenosos por venodisección es un factor de riesgo significativo para bacteremias. En Estados Unidos se ha estimado que más de 60,000 casos de bacteremias nosocomiales son causadas anualmente por catéteres intravasculares.⁸⁷ Tomando en cuenta que el presente estudio fue llevado a cabo en un hospital de tercer nivel y que la cateterización es un procedimiento usual, muchos de los casos pueden ser debido a esto; estableciendo a lo anterior como factor de riesgo para el desarrollo de bacteremia.⁸⁷

Los microorganismos más frecuentemente encontrados fueron los SCN siendo el *Staphylococcus epidermidis* por si solo el microorganismo más aislado en cinco años (Tabla No. 3). Los SCN representan el 59.16% del total de los aislamientos de *Staphylococcus*. El aislamiento de estos microorganismos en parte refleja que la causa principal de estas bacteremias no es la infraestructura, ni la economía hospitalaria sino el personal médico y paramédico que no toma las suficientes precauciones asépticas al colocar los implementos invasivos y al tomar las muestras para hemocultivo sin olvidar la capacidad de los *Staphylococcus* de sintetizar un polisacárido (limo) que puede ser el factor responsable para que estos microorganismos se adhieran al plástico (material de catéteres, válvulas etc.) así como su resistencia a la fagocitosis y a su comportamiento ante ciertos antimicrobianos donde se ha reportado con más frecuencia la producción de β - lactamasas y resistencia a oxacilina y meticilina.⁸⁶ Nordi- Lozano y cols encontraron en un 71.7% de los aislamientos de *Staphylococcus* resistencia a la oxacilina.⁶¹

Los SCN pueden constituir pseudobacteremias pues en la mayoría de los casos los pacientes no presentan signos y síntomas que refieran una verdadera bacteremia.

⁶¹ A los hemocultivos positivos con SCN se les debe hacer una evaluación muy cuidadosa para diferenciar entre bacteremia y contaminación; ya que algunos pueden ser patógenos letales principalmente en pacientes inmunológicamente comprometidos.

Los hemocultivos positivos con *Staphylococcus aureus*, no necesitan de una evaluación tan cuidadosa para determinar que son productores de verdaderas bacteremias. Su gran virulencia y patogenicidad son capaces de llevar al paciente hasta un choque séptico comprometiendo su vida. La fuente de infección para la adquisición de una infección por este microorganismo puede ser diverso, aunque es muy común aislarlo de heridas quirúrgicas.⁸⁸

De los cocos grampositivos productores de bacteremias, los *Streptococcus* son los menos frecuentes ya que en cinco años se presentaron solo 56 casos (Tabla No. 3). Los *Enterococcus* tuvieron una mayor frecuencia, aislándose un total de 43 casos en cinco años, correspondiendo estas a las especies *faecalis* y *faecium*.

A los enterococos se les considera parte de la flora intestinal, pero actualmente son parte de los patógenos nosocomiales, resistentes a los antimicrobianos de uso común y eficaces receptores de donadores de material genético de otros cocos; además son resistentes a agentes fisicoquímicos, por lo que sobreviven por largo tiempo en el ambiente hospitalario y en las manos del personal.^{87,89} Las bacteremias por enterococos causan inquietud a los médicos por su terapia antimicrobiana que debe ser combinada y se les dificulta administrarla.

Martinez y cols⁸⁷ encontraron que los enterococos ocupan el octavo lugar como causa de infección intrahospitalaria y que es de los principales entre los agentes etiológicos multirresistentes. En el presente estudio no están dentro de los cinco agentes etiológicos principales (Tabla No. 10); pero

cada vez se les da más importancia como agente causal de bacteremias.

En relación a los *Streptococcus* hemolíticos; los α -hemolíticos son los que se presentan con más frecuencia (Tabla No. 3). Entre estos microorganismos esta el *S. pneumoniae* considerado un importante patógeno comunitario que ha desarrollado resistencia a penicilinas, macrólidos y para algunas quinolonas, por lo que su manejo es difícil. Es uno de los principales agentes etiológicos de infecciones respiratorias.⁸⁹

Por otra parte, el aislamiento de bacilos gramnegativos en un hemocultivo indica la presencia de una verdadera bacteremia. El 46.78% de los aislamientos totales fueron provocados por este tipo de bacterias.

Los bacilos gramnegativos que con mayor frecuencia se presentan son las enterobacterias y dentro de estas la *Escherichia coli* fue la más frecuente; teniendo su foco de infección generalmente en el tracto urinario o en el gastrointestinal.⁷⁹

Existe un fenómeno llamado translocación bacteriana que explica en parte la alta frecuencia de este tipo de bacterias. Este depende de la necesidad de hacer funcionar el tracto digestivo en pacientes en estado crítico que se encuentran inmóviles aumentando la permeabilidad intestinal rompiendo esta barrera provocando que toxinas y bacterias escapen del tracto gastrointestinal yendo a la circulación general, en

principio por vía mesentérica linfática y la circulación porta ocasionando una infección bacteriana sistémica.⁹⁰

Es así que la *Escherichia coli* por si sola representa el 30.35% de los aislamientos de bacilos gramnegativos, en el período que abarcó el estudio.

Le siguen en frecuencia los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* con un total de 60 y 72 aislamientos respectivamente estos géneros producen bacteremias primarias y secundarias, teniendo la capacidad de sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes, creciendo con facilidad en soluciones glucosadas y en las manos del personal médico y paramédico.^{46,79}

Los géneros *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus* y *Serratia* no son muy frecuentes en el periodo de estudio tan solo se aisló un 8.29% aunque su presencia causa inquietud en los médicos tratantes por la resistencia antimicrobiana representando una alta mortalidad.

Las bacteremias por el género *Salmonella* son poco frecuentes solo se aislaron 3.32% en cinco años, son primarias y representan una baja mortalidad generalmente son no nosocomiales (Tabla No. 6).

El aislamiento de enterobacterias puede ser señal del mal control higiénico que se tiene con el paciente.⁹¹

Las bacteremias por bacilos gramnegativos no fermentadores son de gran interés por considerarse la mayoría de veces nosocomiales. Se aislaron un total de 147 microorganismos

de este tipo representando el 14.29% del total de las bacteremias (Tabla No. 7).

El agente etiológico de este grupo más frecuente es la *P. aeruginosa* produciendo bacteremias secundarias.⁷⁹ Las *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales mínimos y son capaces de tolerar diferentes condiciones físicas como de temperatura y humedad así que pueden crecer prácticamente en cualquier sitio.⁵⁴ Tienen la capacidad de adherirse a través de sus fimbrias al epitelio respiratorio, lesionado por la intubación endotraqueal, así como por el uso de sondas nasogástricas y bloqueadores de H₂, lo cual favorece la colonización bacteriana.⁶⁴

Afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, sometidos a ventilación mecánica y a uso de nebulizadores, debido a su predilección por ambientes húmedos, es el principal agente causal de bacteremias en pacientes quemados.⁶⁴

Núñez y cols.⁶⁴ reportan una frecuencia del 80% de *P. aeruginosa* de los bacilos gramnegativos no fermentadores, en este estudio se encontraron 85 aislamientos representando el 57.82% de las bacterias no fermentadoras aisladas (Tabla No.7).

La mayor preocupación de tener bacteremias por *Pseudomonas* es la resistencia a los antimicrobianos lo cual es debido a su capacidad de mutar por la presencia de plásmidos, por tanto son difíciles de erradicar.

El género *Acinetobacter* es el segundo en frecuencia con 38 aislamientos 25.85%, es un patógeno oportunista que ocasiona infecciones de heridas quirúrgicas, quemaduras, y tracto urinario.

Núñez y cols.⁶⁴ reportaron al *Acinetobacter* como agente etiológico asociado a infecciones nosocomiales concluyendo que la piel del hombre es probablemente la fuente más importante de brotes en infecciones nosocomiales.

Del género *Stenotrophomonas* con el 14.96% y de la *Burkholderia* con solo el 1.36%. Todos los géneros son capaces de provocar graves problemas y aumentar la tasa de mortalidad de los pacientes.

Los bacilos gramnegativos se distribuyen en las diferentes áreas hospitalarias prevaleciendo en las áreas de terapia intensiva por tener la población con más factores de riesgo.

Las bacteremias por anaerobios obligados fueron poco frecuentes ya que solo se encontraron un total de 21 casos 2.04% en cinco años. El género aislado es *Bacteroides* y las especies más frecuentes son *fragilis* y *ovatus* (Tabla No. 8). Aunque el tema de estudio fueron las bacteremias, se debe mencionar la presencia de levaduras en los hemocultivos analizados considerándose a la *Candida albicans* con 52 casos y a la *Candida sp* con 43 casos.

Las levaduras son agentes oportunistas que infectan fácilmente a los pacientes inmunodeprimidos. Los factores que pueden aumentar la infección por levaduras son la

alimentación parenteral, cirugía gastrointestinal, terapia con corticoesteroides en dosis farmacológicas y la administración de antibioterapia de amplio espectro por tiempo prolongado. De acuerdo con otros estudios se ha visto que las especies de *Candida* son los agentes etiológicos que con más frecuencia causan fungemia en pacientes que se encuentran hospitalizados principalmente en las áreas de cuidados intensivos donde de manera implícita se les somete a maniobras de tipo invasivo, destacando al igual que en el presente estudio un amplio predominio de *Candida albicans*.⁹²

Las fungemias son una causa de sepsis nosocomial principalmente. Las áreas del hospital donde más se presentaron son las unidades de terapia intensiva por tener más factores de riesgo en estas áreas, la mayor parte de los pacientes tienen una alimentación parenteral.

En las áreas de terapia intermedia y admisión general también se encontraron hemocultivos con levaduras estas pueden ser causadas por líquidos para infusión intravenosa contaminados o por infecciones cruzadas a través de manos contaminada

11 CONCLUSIONES

- a) En las áreas de cuidados intensivos se encontró un mayor número de bacteremias y fungemias. El uso de implementos invasivos es una de las principales causas de bacteremias nosocomiales.
- b) Inesperadamente, los hemocultivos para *Candida* ocuparon un porcentaje considerable en el presente estudio, lo cual podría considerarse como una llamada de atención para tomar en cuenta las infecciones por este tipo de microorganismos.
- c) Existe un incremento notable en la *frecuencia* de microorganismos considerados terciarios como *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN), *Candida* y enterococos igualando o superando en algunos casos a los microorganismos con clásico predominio nosocomial como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- d) El incumplimiento de las medidas de control de infecciones como lavado de manos, preparación adecuada de soluciones, uso de bata, cubrebocas etc; incrementa la frecuencia de bacteremias y fungemias. La utilización de programas de vigilancia de infecciones hospitalarias tienen como finalidad implementar estrategias que reduzcan la frecuencia de dichas infecciones.

e) Los porcentajes de los diferentes microorganismos encontrados en el presente estudio y los reportados por otros autores, difieren entre si pudiendo establecer que las diferencias en los porcentajes encontrados es por como los procedimientos son llevados a cabo y no tanto por el tipo de institución donde se realiza este procedimiento (hemocultivo) ya sea pública o privada.

12 REFERENCIAS

1. Kruif P. Los cazadores de microbios. Barcelona: Salvat; 1986:17.
2. Navarrete S, Muñoz O, Sánchez PI. Infecciones intrahospitalarias en pediatría. México: Editorial McGraw Hill Interamericana, 1998; 55,81,125.
3. Nardi LME, Pérez DM. Bacteremia y pseudobacteremia causada por *Staphylococcus* coagula negativa en niños. Gac Méd Méx 2001; 137(2):1.
4. Picazo J. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España 1993: 1-2.
5. Ponce de León SR, Rodríguez M. Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias. 2ª ed. México: Editorial Glaxo Wellcome, 1998: 129.
6. Ponce de León SR, Soto JH. Infecciones intrahospitalarias. México: Editorial McGraw Hill Interamericana, 1996; 7-255.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-026.SSA-2 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Rev Méd IMSS 2001; 36(6): 539-560.

8. Koneman E, Allen S, Janda W. Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color. 5ª ed. España: Editorial Panamericana, 2001;154.
9. Brun BC. Impact of bacteremia on outcome. Pulmonary reviews. Trend in pulmonary and critical care medicine 2001; 6(9).
10. Lab diagnosis of bacteremia. Copyright GW school of medicine. Hemocultivo. Microbiología. Info Lab Clín 2004.
11. Macias HA. El control de las bacteremias y la importancia del hemocultivo. Enfer Infec Microbiol 1996; 16(4): 202-203
12. Velásquez LR. Bacteremia sostenida por *Salmonella choleraesuis*. Enf Inf y Microbiol 1998; 18(1): 15-16.
13. Barker MD. Evaluation and management of infants with fever. Pediatr Clin North Am 1999; 46(6): 1061-1072.
14. Luszczak M. Evaluation and management of infants and young children with fever. Am Fam Physician 2001; 64: 1219-1226.
15. Ponce GA. Neutropenia y fiebre. Enf Infec Microbiol 1997; 17(6):1-2.
16. Sampaio J, Derossi A, Gallo H. Tópicos da medicina laboratorial septicemia. CEPLAM. Centro de estudios e pesquisas do lámina 2003.
17. Weller AN, Nicholson B. The spectrum of *Bacillus* bacteremias in heroin addicts. Arch Inte Med 1979; 139(3):1.
18. Duerden J. Microbiología de enfermedades infecciosas. México: Noriega Editores, 1999; 132-133.
19. Maldonado RN. Control de infecciones y vigilancia en la unidad de cuidados intensivos coronarios y terapia intensiva posquirúrgica cardiovascular. Rev Méx de Enfermería cardiológica 1999; 7 (1-4): 5-11.
20. Weinstein R. Nosocomial infection update. Emerg Infec Dis 1998; 4(3): 416-419.
21. Rangel FM. Comentario sobre las infecciones nosocomiales. Enf Infec y Microbiol 1997;17(1):10-11.
22. Murray P, Kobayashi GA. Microbiología médica. 2ª ed. España: Editorial Harcourt Brace, 1999; 166,199,253,277,280,309.
23. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2000: 257,263,287,332.

24. García RJ, Picazo J. Compendio de microbiología médica. España: Editorial Harcourt-Brace 2000; 114-184,552,558,720,727.
25. Tay ZJ. Microbiología y parasitología médica. 3ª ed. México: Méndez Editores 2003; 70-118.
26. Brooks F, Jawetz M. Microbiología médica. 17ª ed. México: Editorial El Manual Moderno 2002; 243-237.
27. García RJ. Microbiología médica general. Madrid España: Editorial Harcourt Brace 1998; 179-291.
28. Rayo MO, Sigfrido RF. Infecciones producidas por bacterias grampositivas, controversias relacionadas al desarrollo de resistencia. *Enf Infec y Micro* 2002; 22(2): 55-61.
29. Rayo O, Donis JH. Infecciones nosocomiales por bacterias grampositivas multirresistentes: La actividad de nuevos antimicrobianos. *Enf Infec y Microbiol* 2000; 22(2): 55-61.
30. Volkow P, De la Rosa M, Gordillo P. Tendencias de infecciones intrahospitalarias en un centro oncológico, 1986-1996. *Salud Pública Méx* 2000; 42(3): 181-187.
31. Mims P, Roitt W. Microbiología médica. 2ª ed. España: Editorial Harcourt Brace, 1999; 146-147.
32. Castellanos UA. Nuevos enfoques sobre la fiebre de origen desconocido. *Prácticas pediátricas* 1999; 146-147.
33. McKenzie EN. Fiebre: la subida del termostato corporal. *Nursing* 1999.
34. Gallardo PU, García PA. Incidencia de las infecciones intrahospitalarias en los servicios de angiología. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 2002; 3(1): 21-25.
35. Nuñez TF, Cashat CM. Infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos no fermentadores en el hospital infantil de México. *Enf Infec y Microbiol* 1997; 17(1): 16-19.
36. Sifuentes OJ, Guerrero AM, Ponce GA. Tendencia de las bacterias y factores de riesgo de muerte en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. 1981 a 1992. *Gac Méd Méx* 2001; 137(3): 191-202.
37. Kingsbury D, Wagner G. Manual de microbiología médica. México: Editorial Limusa, 1991; 403-408.
38. Carrige N, Christof VE, Konstanze M. As a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 2001; 344(1): 11-15.

39. Martínez RH, Anaya GV, Gorbea R. Infecciones nosocomiales en un servicio de pediatría de un hospital de tercer nivel. Rev Méx de Pediatría 2001; 68(2): 56-65.
40. Thylefors J, Harbarth S, Didier P. Infection control and hospital epidemiology increasing bacteremia due to coagulase negative *Staphylococcus* fiction or reality. J Epidemiol Am, 1998; 19(8):5-9.
41. Capdevilla JA, Planes AM, Palomar M. et al. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter related sepsis. Eur J Clín Microbol Infect Dis 1992; 403-407.
42. Navarrete S, Muñoz O, Sánchez PI. Infecciones intrahospitalarias en pediatría. México: Editorial McGraw Hill Interamericana; 1998.
43. Volkow P, De la Rosa M, Gordillo P, Vilar DC. Tendencias de infecciones intrahospitalarias en un centro oncológico, 1986-1996. Salud Pública Méx. 2000; 42 (3): 181 – 187.
44. Macias AH. El control de las bacteremias y la importancia del hemocultivo. Enf Infec Microbiol. 1996; 16(4): 202-203.
45. Mandell GL, Bennett JE. Enfermedades infecciosas principios y práctica. Vol. 2. 5ª ed. Madrid : Editorial Médica Panamericana; 2002.
46. Ponce de León SR. Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias. 2ª ed. México: Glaxo Wellcome; 1998.
47. Capdevilla JA, Planes AM, Palomar M. et al. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter related sepsis. Eur J Clín Microbiol Infect Dis. 1992; 403 – 407.
48. Finegold SM, Baron EJ, Bailey S. Diagnóstico microbiológico. 7ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1996.
49. Técnicas microbiológicas para el diagnóstico de las infecciones cutáneas y partes blandas. SAMPAC Exudados. 2003; 1-12.
50. Sampaio J, Derossi A, Gallo H. Tópicos da medicina laboratorial – septicemia. CEPLAM. Centro de Estudios e Pesquisas do Lâmina 2003.
51. Arango Á, Mattar S, Bochagá J. Epidemiología de la colonización de catéteres intravasculares en un hospital universitario de Bogotá, Colombia. Enf Infec Microbiol. 1998; 18(2): 51-58.
52. Renaud B, Brun CB. Outcomes of primary and catheter related bacteremia: a cohort and case control study in critically ill patients. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163: 1584 – 1590.

53. Soufin L, Timst JF, Mahe C. et al. Attributable morbidity and mortality of catheter related septicemia in critically ill patients: a matched, risk adjusted, cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999; 20: 396-401.
54. Rangel MF, Sifrigio M. Comentario sobre las infecciones nosocomiales *Enf Infec Microbiol.* 1997; 17(1):10-11.
55. Brooks F. *Microbiología médica* . 17ª ed. México: El Manual Moderno; 2002
56. Astagneau P. Prevalence of nosocomial infections in France: results of the nationwide survey in 1996. *J Hosp Infect.* 2000; 46: 186-193.
57. Raymond J, Aujard Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a european multicenter prospective study. *Infect Cont Hosp Epidemiol.* 2000; 21(4):260-263.
58. Soto JH, Ramírez MC. Infecciones nosocomiales en un hospital de pacientes neurológicos, análisis de 10 años. *Gac Méd Méx.* 2002; 138(5): 397- 403.
59. Díaz R, Solórzano FS, Padilla B. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Pública Méx.* 1999; 41(1): S12-S17.
60. León AR, Cashat MC, Ávila C. Infecciones nosocomiales en el hospital infantil de México. *Enf Infec Microbiol.* 1996; 16(4): 219-223.
61. Nardi ML, Pérez MD. Bacteremia y pseudobacteremia causada por *Staphylococcus coagulasa negativa* en niños. *Gac Méd Méx.* 2001; 137 (2): 1
62. Martínez GA, Anaya MA. Incidencia de bacteremia y neumonía nosocomial en una unidad de pediatría. *Salud Pública Méx.* 2001; 43 (6): 515 –523.
63. Leibovici L, Schonheyder H, Pitlik SD. Bacteremia caused by hospital-type microorganisms during hospital stay. *J Hosp Infect.* 2000; 44: 31-36.
64. Nuñez FT, Cashat MC, Ávila C. Infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos no fermentadores en el hospital infantil de México. *Enf Infec Microbiol.* 1997; 17(1): 16-19.
65. Salazar HH, Mireles MH, Moreno MD, Martínez LB. Infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. *Rev Méd IMSS.* 2002; 40 (1): 43 – 51.
66. Solomon S. About the 4th Decennial international conference on nosocomial and healthcare associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(2): 169.
67. Jarvis JD. *Bacteriología clínica básica*. México: Editorial El Manual Moderno; 1976.

68. Picazo JJ. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España: 1993.
69. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2001.
70. Técnicas microbiológicas para el diagnóstico de las infecciones cutáneas y partes blandas. SAMPAC Hemocultivos. 2003; 10 -12
71. Wilson ML, Weinstein MP, Reimer LG, Mirret S, Reller LB. Controlled comparison of the bact / alert and BACTEC 660 / 730 non radiometric blood culture systems. J Clin Microbiol. 1992; 30: 323 – 329
72. Lennette HB. Manual de microbiología clínica. 4ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1985.
73. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. Microbiological methods. 7th ed. Great Britain: Butterworth Heinemann; 1999.
74. Truant AL. Manual of commercial methods in clinical microbiology. USA: Ed Asm Press, 2002; 12-21,413-428.
75. Hughes DE, Wimpenny JT. Oxygen metabolism of microorganisms. Adv Microbiol Physiol. 1989; 3: 197.
76. Skoog DA, Holler JA, Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. España: Editorial Mc Graw- Hill; 2001.
77. Becton Dickinson, Bactec System News. Lab O 2000; 11(2): 3-4.
78. Juárez IE, Vázquez AR, Game JE. Costos de infecciones intrahospitalarias de un grupo de pacientes en un hospital de tercer nivel de atención. Gac Méd Méx. 1999; 135(5): 457-462.
79. BACTEC. La ventaja de las resinas máximo cuidado para el paciente. Becton Dickinson de México.
80. Fuller D, Davis ET. Comparison of BACTEC plus aerobic / F, and lytic / F media with and without fastidious organism supplement to conventional methods for culture of sterile body fluids. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997; 29: 219 – 225.
81. Waite RT, Woods LG. Evaluation of bactec myc O/F lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood. J Clin Microbiol. 1998; 36 (5): 1176 – 1179.
82. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: genera principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 1998; 26: 973 – 980.
83. Wayne PA. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically.

- Approved Standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards.2000.
- 84.Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100- 59. National Committee for Clinical Laboratory Standards.1999.
- 85.Wayne PA. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed. Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards.2000.
- 86.Rayo OM, Donis JH, Arredondo J. Infecciones nosocomiales por bacterias grampositivas multirresistentes: la actividad de nuevos antimicrobianos. *Enf Infec Microbiol.* 2002; 22 (2): 55 – 61.
- 87.Martínez HR, Anaya VG, Gorbea MR. Infecciones nosocomiales en un servicio de pediatría de un hospital de tercer nivel. *Rev Méx Pediatr.* 2001; 68(2): 56 – 65.
- 88.Carrige CN, Karstein B, Konstanze M. As a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med.* 2001; 344(1): 11-15.
- 89.Rayo OM, Sigfrido FR. Infecciones producidas por bacterias grampositivas, controversias relacionadas al desarrollo de resistencia. *Enf Infec Microbiol.* 2002; 22(2): 46-50.
- 90.Maldonado NR. Control de infecciones y vigilancia en la unidad de cuidados intensivos coronarios y terapia intensiva posquirúrgica cardiovascular. *Rev Méx Enf Cardiol.* 1999; 7 (1-4): 5-11.
- 91.Gallardo UP, García AP. Incidencia de las infecciones intrahospitalarias en los servicios de angiología. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2002; 3(1): 21-25.
92. .Salazar JS. Importancia del examen micológico directo y frecuencia de levaduras oportunistas en pacientes hospitalizados en el área de UCIN, UTI y pediatría en el Hospital Regional Adolfo López Mateos. Tesis de licenciatura inédita, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2005.

ANEXOS

Reacciones bioquímicas:

OXIDASA

Empleo

Para identificación de citocromooxidasa en microorganismos.

Composición

La zona reactiva de una tira de ensayo contiene: dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0.1 μmol ; 1-naftol 1.0 μmol .

Fundamento:

La citocromooxidasa es una enzima del grupo de la porfirina férrica muy difundida en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma en la forma reducida e inactiva. Por transferencia de los electrones a oxígeno molecular la citocromooxidasa se transforma de nuevo en la forma activa.

En presencia de oxígeno molecular el sistema citocromooxidasa/citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo NaDi (1-naftol + dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol.

CATALASA

Empleo

Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Fundamento:

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo y por lo tanto descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

COAGULASA

Esta prueba consiste en comprobar la facultad de un organismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa.

La coagulasa se haya presente en dos formas, "libre" y "fija":

- ✓ Coagulasa fija (prueba en portaobjeto): la coagulasa fija, conocida como "factor de aglutinación", está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en el plasma provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjeto.
- ✓ Coagulasa libre (prueba en tubos): la coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina, que se haya presente en los filtrados de cultivo. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se

mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma.

- *Método para obtener una atmósfera a presión reducida.*

ANAEROCULT C

Fundamento:

Anaerocult C se utiliza para producir una atmósfera reducida en oxígeno y enriquecida en CO₂, dentro de un recipiente de anaerobios de 2.5 L, con aproximadamente el 8-10% V/V de CO₂ y el 5-7% V/V de oxígeno, para cultivar bacterias del género *Campylobacter* y otros microorganismos con exigencias similares (p.ej. género *Neisseria*, género *Campylobacter*, *Eikenella corrodens*, género *Haemophilus*).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS

❖ *Para cocos grampositivos*

Nitrato (NIT): la reducción de nitrato a nitrito se detecta por la formación de un color rojo después de añadir ácido sulfanílico al 0.8% y N,N dimetil alfa naftilamina al 0.5%.⁷⁶

Novobiocina (NOV): algunos estafilococos se caracterizan por ser resistentes a bajas concentraciones (1.6 µg/mL) de novobiocina.

Glucosidasas (PGR, PGT): la habilidad de un organismo de producir una enzima glucosidasa específica, se detecta por la ruptura del complejo carbohidrato nitrofenil liberando nitrofenol, el cual es amarillo en color.

Indoxil fosfatasa (IDX): la hidrólisis del indoxil fosfatasa, produce un componente azul insoluble. La mayoría de los estafilococos coagulasa y DNAsa positivos son IDX positivos.

Voges-Proskauer (VP): el acetilmetilcarbinol producto de la glucosa, reacciona con hidróxido de potasio al 40% y alfa naftol al 5% dando lugar a un color rojo.

Optoquina (OPT): sensibilidad a la optoquina es característica de *Streptococcus pneumoniae*. Otros estreptococos y estafilococos no son inhibidos por la optoquina.

Fosfatasa (PHO): la fosfatasa alcalina rompe las moléculas del p-nitrofenil fosfato produciendo fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cual es de color amarillo.

Bilis esculina (BE): organismos capaces de crecer en bilis al 40% y de hidrolizar la esculina, se detectan por la producción de un precipitado negro, resultado de la reacción del producto hidrolítico esculina con citrato férrico. El grupo estreptococos D, algunos *Streptococos viridans* y algunos estafilococos son BE positivos.

Pirrolinodil-β-naftilamida (PYR): organismos que producen pirrolidonasa rompen la *L-pirrolinodil-β-naftilamida* en *L-pirrolidona* y *β-naftilamina*, la cual combina con el reactivo *peptidasa-(p-dimetilaminocinnamaldehído)* para producir un color rojo.

Arginina (ARG): la deshidrolización de la arginina resulta en la alcalinización del medio, lo cual se detecta por el cambio del color amarillo a rojo en el indicador rojo fenol.

Urea (URE): la enzima ureasa divide las moléculas de urea dando lugar a la formación de amoníaco. El incremento resultante de pH, se detecta por el indicador rojo de fenol.

Carbohidratos (RAF, LAC, TRE, MNS, SOR, ARA, RBS', INU, MAN): la fermentación de un carbohidrato específico, resulta en la formación de ácido. La consiguiente baja de pH se detecta por el indicador rojo fenol, el cual se torna amarillo.

NaCl al 6.5% (NaCl): la tolerancia al cloruro de sodio al 6.5% se demuestra con crecimiento. La tolerancia salina, se usa para distinguir entre enterococos y no-enterococos.

Bacitracina (BAC): la sensibilidad a bajas concentraciones de bacitracina es indicada por la ausencia de crecimiento y es característica de *Streptococcus pyogenes*.

Piruvato (PRV): el uso de piruvato resulta en la formación de ácido. La baja de pH resultante, se detecta mediante el indicador rojo fenol, el cual se torna amarillo.

β-lactamasa (BL.): la presencia de β-lactamasa se puede demostrar añadiendo yodo y penicilina al pocillo BL. La ruptura del anillo betalactámico forma puntos de aglomeración más competitivos por el yodo que por moléculas de almidón. Si hay β-lactamasa presente, el yodo se adhiere al anillo betalactámico y ocurre una reacción incolora. Si no hay β-lactamasa presente, el yodo se combina con las moléculas de almidón dando un color azul oscuro-negro.

NOTA: en paneles que no tienen el pocillo de β-lactamasa (BL), es conveniente realizar una prueba de nitrocefina.

Hemólisis (HEM): las estreptolisinas S y O producidas por los estreptococos, causan una lisis total o parcial de los hematíes en agar que contenga sangre de cordero.

Tabla de interpretación de pruebas bioquímicas para cocos grampositivos⁷²

Resultados

A. Resultados Bioquímicos

1. Interpretaciones Bioquímicas

Pocillo	Reactivo	Positivo	Negativo
CV MS NOV OPT NAACL BAC		Crecimiento	Sin crecimiento
NIT	Añada una gota de 0.3% ácido sulfanílico y una gota de 0.5% N, N-Dimetil-alfa-naftilamina. Espere 5 minutos para desarrollo de la reacción.	Rosa a Rojo	Transparente (incoloro) Podría ser un rosa muy pálido
PGR PHO PGT	Cualquier tono amarillo debe interpretarse como positivo. Use el pocillo NOV como control negativo.	Amarillo	Transparente (incoloro)
IDX		De azul a gr.s / precipitado	Transparente (incoloro) o precipitación blanca
VP	Añada una gota de 40% KOH y una gota de 5% Alfa Naftol. Espere al menos 20 minutos para que desarrolle la reacción.	Rosa a Rojo	Transparente (incoloro) a Marrón Podría ser nebuloso o Rosa muy pálido
BE		Marrón oscuro a Negro	Transparente (incoloro) a Marrón claro
PYR	Añada dos gotas de reactivo Peptidasa. Espere 2 minutos para que desarrolle la reacción.	Rojo/Naranja a Rojo	Amarillo a Naranja/Rojo
ARG		Rosa/Naranja a Rosa	Amarillo a Naranja
URE		Rosa	Amarillo a Naranja
RAF LAC TRE MNS SOR ARA RBS INU MAN PRV	Cualquier tono naranja debe considerarse negativo.	Amarillo	Naranja a Rojo
BL*	Añada una gota de solución de Penicilina. Deje incubar por 30 minutos. Añada una gota de reactivo de yodo. Registre en cinco minutos.	Incoloro	Negro
HEM		Beta	Alfa o Gama
LOC	Solamente para reconocimiento de panel de sistemas auto-SCAN®-1 y WalkAway®		

* NOTA: En paneles que no tienen el pocillo de β -lactamasa (BL), es conveniente realizar una prueba de nitroceolina.

Tabla de interpretación de pruebas bioquímicas para bacilos gramnegativos⁷²

Resultados			
A. Resultados bioquímicos			
1. Interpretaciones bioquímicas			
pocillo	reactivo	Positivo	negativo
GLU		Solo amarillo fuerte	De naranja a rojo
		Algunos no-fermentadores podrían producir un color dorado el cual debe considerarse negativo	
SUC SOR RAF RHA ARA INO ADO MEL		De Amarillo a Amarillo/Naranja	De Naranja a Rojo
URE		De majenta a rosa	Amarillo, Naranja o Rosa pálido
H ₂ S		Precipitado negro o botón negro	No ennegrece
IND	Añada 3 gotas (1 gota si el panel se leera manualmente) de Reactivo de Kovak MicroScan® El color se desarrolla inmediatamente	Rosa a Rojo	Amarillo Palido a Naranja
		<i>Providencia sp.</i> podría producir un anillo rosa palido, el cual debe considerarse positivo	
Compara LYS, ARG y ORN con DCB. El pocillo DCB debe cubrirse con aceite para que los siguientes resultados sean validos. Para no fermentadores, una prueba positiva debe ser significativamente mas purpura que el control base. Si el control base es purpura el medio basal ha sido alcalinizado y LYS, ARG y ORN deben registrarse como negativos. Las especies <i>Acromobacter</i> y <i>Ocrobactrum antropi</i> tienden a dar estos resultados			
LYS ARG ORN		Fermentadores De Purpura a Gris	Amarillo No-fermentadores De incoloro a gris
TDA	Añadir una gota de cloruro ferrico 10% el desarrollo de color es inmediato	Cualquier tono de marron	De amarillo a naranja
ESC		De marron claro a negro	Transparente
VP	Añadir una gota de KOH 40% seguida de una gota de alfa naftol 5%. Espere al menos 20 minutos para que desarrolle la reacción	Rojo	transparente
		Algunos no fermentadores prodrian producir un color rosa palido después de 18 horas de incubación, el cual debe considerarse negativo	
ONPG		Amarillo	transparente
		Compare cualquier pocillo ONPG que parezca transparente, al pocillo de centrímid. Si en la comparación el ONPG muestra cualquier tono amarillo, regístrese como positivo	
CIT MAL TAR ACE		Azul a azul-verde	De verde a amarillo
		Cualquier tono azul se considera positivo	
CET		Crecimiento	No crecimiento
ORG	NOTA: compare con el control base OF, si la base OF es verde: Si la base OF es azul o azul-verde	Amarillo De amarillo a verde	De verde a azul azul
NIT	Añada una gota de acido sulfanilico 0.8%, seguida de una gota de N, n-Dimetil-alfa-naftilamina 0.5% Espere 5 minutos para que se desarrolle la acción	Rojo	Transparente o rosa palido
P4, K4		Crecimiento	No crecimiento

❖ **Para bacilos gramnegativos**

Fermentación de carbohidratos (GLU, SUC, SOR, RAF, RHA, ARA, INO, ADO, MEL): la fermentación de un carbohidrato específico resulta en la formación de ácido. La baja resultante de pH, se identifica por el indicador rojo de fenol.

Sulfuro de hidrógeno (H₂S): a partir de tiosulfato de sodio se produce sulfuro de hidrógeno gaseoso que reacciona con los iones férricos del medio para producir un precipitado negro.

Indol (IND): el metabolismo del triptófano da lugar a la formación de indol, que sé detecta con la adición de reactivo de Kovac. Si hay producción de indol se desarrolla un color rojo.

Lisina, arginina, ornitina, (LYS, ARG, ORN): la descarboxilación de estos aminoácidos resulta en la formación de aminas básicas, las cuales son detectadas por el indicador púrpura de bromocresol.

Triptófano desaminasa (TDA): bacterias capaces de desaminar el triptófano, producen ácido indol pirúvico que reacciona con el citrato férrico amónico del medio y el cloruro férrico produciendo un color marrón.

Hidrólisis de la esculina (ESC): la hidrólisis de la esculina se detecta por el citrato férrico amónico del

medio, que reacciona con los productos hidrolíticos para formar un precipitado negro.

Galactosidasa (ONPG): la β -galactosidasa hidroliza el orto-nitrofenil- β -D- galactopiranosido que libera orto-nitrofenol de color amarillo.

Citrato, malonato, acetamida, tartrato (CIT, MAL, ACE, TAR): el utilizar estos sustratos como la única fuente de carbono para el metabolismo, resulta en un incremento de pH que se detecta mediante el indicador azul de bromotimol.

Oxidación/Fermentación (OF/G): la oxidación de glucosa resulta en la formación de ácido, el descenso de pH puede detectarse mediante el indicador azul de bromotimol.

TINCIÓN DE GRAM

Técnica:

- ✓ Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
- ✓ Se fija el material en el portaobjeto pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción.
- ✓ Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta.

- ✓ Después de un minuto de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada.
- ✓ Se cubre el frotis con solución de yodo durante un minuto. Se lava nuevamente con agua.
- ✓ Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona hasta que no se desprenda color violeta.
- ✓ Se lava con agua corriente y se coloca otra vez sobre el soporte. Se cubre la superficie con contratinción de safranina durante un minuto. Se lava con agua corriente.
- ✓ Se coloca el preparado en posición vertical dejando que drene el exceso de agua.
- ✓ Se examina el frotis en el microscopio.

Interpretación:

Las bacterias grampositivas se tiñen de color azul oscuro y las bacterias gramnegativas se ven de color rojo rosado.

AGAR SANGRE

Para el aislamiento, cultivo y actividad hemolítica de gérmenes difíciles. La base de agar sangre es adecuada para

aislar y cultivar diversos microorganismos . Al añadir sangre , puede usarse para descubrir la actividad hemolítica.

AGAR CHOCOLATE

Este medio es básicamente el mismo que el agar sangre, pero con la adición de la sangre a la base mientras está aún está a 80 °C, las proteínas se precipitarán, los globulos rojos se lizarán y la hemoglobina se convertirá en hematina, haciendo con ello a estos nutrientes más fácilmente accesibles para el crecimiento de los organismos más exigentes como para *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*.

AGAR SAL Y MANITOL

Es un medio selectivo muy empleado para aislar estafilococos patógenos de materiales clínicos diversos (orina, genitales, heridas, exudados faríngeos, etc.). También se utiliza en la industria alimenticia con los mismos fines, el aislamiento e identificación de estafilococos que se encuentran en la leche y productos lácteos, carnes y derivados cárnicos incluyendo conservas de pescado. La degradación del manitol con producción de ácido cambia el color del medio, de rosado a amarillo. Debido a su alto contenido de cloruro de sodio, puede hacerse una siembra masiva del material en estudio.

AGAR McCONKEY

Medio empleado ampliamente para aislar e identificar selectivamente a enterobacterias como *Salmonellas*, *Shigellas* y coliformes a partir de heces fecales, orinas, aguas negras y diversos alimentos.

Los gérmenes grampositivos son inhibidos por las sales biliares y el cristal violeta. Las enterobacterias fermentadoras de lactosa bajan el pH del medio que es detectado por el indicador rojo neutro dando colonias rojas o rosadas. Las no fermentadoras de la lactosa dan colonias transparentes, incoloras o ambarinas. Crecen también bacilos gramnegativos que no pertenecen a las enterobacterias como *Pseudomonas* y *Aeromonas*. Pueden desarrollarse un número reducido de colonias puntiformes de *Enterococcus faecalis* de color rojo y de algunos estafilococos cuyas colonias son pequeñas, opacas de color rosa pálido.

ABREVIATURAS

< : menor de

> : mayor de

°C: grados centígrados

ACE: acetamida

ARG: arginina

ASO: antiestreptolisina

ATCC: American Type Culture Collection.

BAC: bacitracina

BE: bilis esculina

BHI: infusión cerebro corazón

BL: β -lactamasa

CIE: contraimmunoelectroforesis

CIT: citrato

DPNasa: difosfopiridina nucleotidasa

EDTA: etilendiaminotetraacetato

ESC: hidrólisis de la esculina

GLC: cromatografía con gas líquido

H₂S: sulfuro de hidrógeno

HEM: hemólisis

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

IDX: indoxil fosfatasa

IN: infección nosocomial

IND: indol

ISO: Organización Internacional de Estándares

LED: diodos emisores de luz

LPS: lipopolisácarido

LYS: lisina

MAL: malonato

MIC: concentración mínima inhibitoria

mm³: milímetros cúbicos

MP: mantenimiento preventivo

M ϕ : macrófago

NCCLS: Comité Nacional para Normas del Laboratorio Clínico

NIT: nitrato

NOV: novobiocina

OF/G: oxidación/ fermentación

ONPG: galactosidasa

OPT: optoquina

ORN: ornitina

PHO: fosfatasa

PMN: polimorfonucleares

SPS: polianetolsulfonato de sodio

TAR: tartrato

UCI: unidad de cuidados intensivos

UFC / mL: unidades formadoras de colonia por mililitro

URE : urea

UTI: unidad de terapia intensiva

VP: Voges-Proskauer

μ L: microlitro

GLOSARIO

A

Absceso: cavidad que contiene pus y está rodeada de tejido inflamado formado como consecuencia de la supuración en una infección localizada.

Acidosis respiratoria: trastorno que se caracteriza por un aumento de los PCO₂ arterial, un exceso de ácido carbónico y un aumento de la concentración plasmática de hidrogeniones.

Alcalosis metabólica: trastorno caracterizado por pérdida significativa de ácidos o por aumento del nivel de bicarbonato.

Aneurisma: dilatación localizada de la pared de un vaso, producida generalmente por aterosclerosis e hipertensión o, con menor frecuencia, por traumatismos, infección o debilidad congénita de la pared vascular.

Angiografía: visualización radiográfica de los vasos con medio de contraste.

Anticuerpo: molécula producida por los animales como respuesta a un antígeno, que tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su producción.

Antígeno: molécula que reacciona con un anticuerpo formado previamente en los receptores específicos de las células T y B.

Artralgia: dolor de una articulación.

Apnea: ausencia de respiración espontánea.

B

Bradycardia: latido lento del corazón, con pulso lento. Trastorno circulatorio que consiste en la contracción regular del miocardio con una frecuencia inferior a 60 latidos por minuto.

Broncoespasmo: contracción anómala del músculo liso de los bronquios que produce un estrechamiento agudo con obstrucción de las vías respiratorias.

C

Cánula: tubo flexible que contiene un trocar duro y puntiagudo y que puede introducirse en el organismo guiado por dicho trocar. Cuando este se retira puede extraerse líquido corporal a través de la cánula.

Catéter: tubo flexible hueco que puede introducirse en un vaso o en una cavidad del organismo para extraer o introducir líquidos.

Cistoscopias: examen de la vejiga urinaria con el cistoscopio. Método o procedimiento mediante el cual se examina el interior de la vejiga.

Colangiografías: radiografía de las vías biliares con medio opaco de contraste; puede ser intravenosa o percutánea.

Colecistectomías: extirpación de la vesícula biliar.

Corticoide: hormona natural o sintética, relacionada con la corteza adrenal, que interviene en la regulación de los procesos orgánicos clave como son el metabolismo de carbohidratos y de proteínas y el equilibrio hidroelectrolítico, y en el funcionamiento del sistema cardiovascular, músculo esquelético, riñones y otros órganos.

D

Disuria: emisión dolorosa o difícil de orinar.

E

Eritema: enrojecimiento de la piel de origen muy variado.

Endocarditis: trastorno que afecta al endocardio y las válvulas cardiacas y responde a múltiples causas. Entre los distintos tipos que presenta destaca la endocarditis bacteriana.

Endotoxina: toxina contenida en las paredes celulares de algunos microorganismos, especialmente bacterias gramnegativas, que se liberan cuando la bacteria muere y se degrada en el cuerpo. Su liberación produce fiebre, escalofríos, shock, leucopenia y otros muchos síntomas según el microorganismo y el estado de la persona infectada.

Enteral: dentro del intestino delgado o vía intestino delgado.

Empiema: acumulo de pus en una cavidad corporal, especialmente el espacio pleural, como resultado de una infección bacteriana como una pleuresía o una tuberculosis.

F

Flebitis: inflamación de una vena.

Fístula: comunicación anormal entre un órgano interno.

H

Hemodiálisis: eliminación de algunos elementos de la sangre a través de una membrana semipermeable por virtud de la diferencia en el índice de difusión, así, la de un riñón artificial.

Hipercalcemia: aumento de calcio en sangre.

Hiperglucemia: aumento de glucosa en sangre.

Hiperventilación: ventilación pulmonar superior a la necesaria para realizar un intercambio adecuado de gases.

Hipotensión: estado anormal en el que la tensión arterial no es adecuada para la perfusión y oxigenación conveniente de los tejidos. Puede estar producida por una expansión del espacio intravascular, un descenso del volumen circulante o un defecto del bombeo cardiaco.

Hipoxemia: déficit anormal de oxígeno en sangre arterial.

I

Ictericia: coloración amarilla de la piel y mucosas por aumento de la bilirrubina sanguínea; se clasifica en prehepática, intrahepática y poshepática.

L

Letargia: estado mental caracterizado por pérdida de la voluntad; el paciente, aunque se encuentra conciente y su función intelectual es normal, es incapaz de actuar.

M

Mialgia: dolor muscular difuso acompañado generalmente por malestar que aparece en enfermedades infecciosas como la brucelosis, dengue, gripe, leptospirosis, fiebre recurrente etc.

O

Ósmosis: movimiento de un solvente puro, como el agua, desde una solución que tiene una concentración de soluto más baja a otra que la tiene más alta y a través de una membrana semipermeable, es decir, permeable al solvente pero no al soluto.

Osteomielitis: infección local o general de hueso y médula ósea, que suele estar causada por bacterias introducidas por traumatismo o cirugía, por extensión directa de una infección próxima o transmitida por vía hemática. Los estafilococos son los microorganismos responsables más frecuentes.

P

Peristaltismo: contracciones coordinadas, rítmicas y seriadas del músculo liso que fuerzan el desplazamiento de los alimentos a través del conducto digestivo, la bilis a través del conducto biliar y la orina a través de los uréteres.

Piodermia: dicese de cualquier enfermedad purulenta de la piel, como el impétigo.

R

Reticuloendotelial: sistema más funcional del organismo implicado principalmente en la defensa frente a las infecciones y en la distribución de los productos provenientes de la destrucción celular. Está compuesto por macrófagos, células de Kupffer de hígado y células reticulares del pulmón, la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos.

S

Séptico: sufijo que significa “corrupción o decadencia” causado por microbios o por las toxinas que segregan.

Signo: hallazgo objetivo percibido por un explorador como fiebre, una erupción, disminución de los sonidos respiratorios cuando existe derrame pleural, etc.

Síntoma: índice subjetivo de una enfermedad o un cambio de estado tal como lo percibe el paciente.

Somnolencia: estado de sueño o adormecimiento.

T

Taquicardia: excesiva rapidez de la acción cardíaca.

Taquipnea: aceleración anómala de la frecuencia respiratoria, que se observa por ejemplo con la hiperpirexia.

