



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
"FEDERICO GOMEZ"

HEMOCULTIVOS: UNA MODIFICACION AL MEDIO BIFASICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A
Q.F.B. JESUS RESENDIZ SANCHEZ

ASESOR: DR. ADOLFO PEREZ MIRAVETE



MEXICO, D. F.

FEBRERO, 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

MI AGRADECIMIENTO

A DIOS: Porque siempre me ha acompañado, por darme los mejores frutos de la vida y por ser mi guía por el camino del éxito.

A LOS NIÑOS DEL HOSPITAL INFANTIL: Que a partir de su enfermedad y sufrimiento fue posible realizar este trabajo; esperando que con ello se disminuya el tiempo de su padecimiento y vuelvan pronto a jugar y sonreír.

EN MEMORIA A MIS PADRES: Pedro Reséndiz † y Columba Sánchez †: Que en la gloria de Dios se encuentran, y que desde aquel lejano lugar podrán ver que la semilla que un día sembraron a comenzado a dar sus frutos.

A MIS HERMANOS: Clara, Rodolfo, Luis, Eduardo, Felipe y Ana: Que gracias a su apoyo, cariño y comprensión, fue posible llagar a concluir una meta mas en mi vida.

A MIS SOBRINOS: Marla, Nancy y Kevin: Porque algún día llegarán mas lejos de lo que he llegado.

A MI GRAN AMIGO: Manuel Rodríguez Ortuño: Por esa amistad tan grande que nos une y por darme siempre la mano para seguir adelante.

AL DOCTOR: Adolfo Pérez Miravete: Mis mas sincero agradecimiento por su inmensa ayuda, por los conocimientos impartidos y por la confianza que siempre tubo en mi.

A LA QFB: Carmen Castellanos Cruz: Por compartir su valioso tiempo y conocimientos, indispensables para la realización de este trabajo.

A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA: Por permitirme desarrollar los conocimientos recibidos y sobre todo por la amistad que me han brindado "gracias amigos".

A LA DOCTORA: Rosamaría Bernal Redondo: Por el apoyo brindado para la realización de este escrito.

A LA FACULTAD. DE QUÍMICA: Por todo el tesoro de conocimientos que me ha dado.

A LAS PROFESORAS: Ma Dolores Lastra, Magdalena Oliva † y Victoria Valles: Porque siempre me motivaron a seguir adelante y tuvieron fe en mi:

A TODAS LAS PERSONAS: Que de alguna u otra forma me han apoyado para llegar a otra etapa importante en mi vida; gracias a ellos y a Dios: *¡Lo hemos logrado!*

Seguiremos adelante...

R E S U M E N

La bacteremia es una infección sistémica grave, un diagnóstico rápido es crucial para los paciente que la padecen. En la actualidad existen equipos automatizados que detectan la presencia temprana de los microorganismos involucrados, pero su elevado costo los hacen inalcanzables para un gran número de laboratorios de bacteriología.

El objetivo de este trabajo fue realizar una modificación al hemocultivo bifásico tipo Ruiz-Castañeda con medio líquido y sólido enriquecido, para disminuir el tiempo de detección a un costo muy bajo.

Esto consistió en la adición de un indicador de pH (rojo de fenol) al medio sólido, para observar primero la producción de metabolitos ácidos o alcalinos, que hacen virar al indicador y posteriormente la aparición de colonias microbianas.

MATERIAL Y METODOS: Se prepararon dos lotes de hemocultivos, a uno se le adicionó rojo de fenol 0.25 g/L. y al otro no.

Ambos se inocularon con el mismo volumen de sangre de pacientes con diagnóstico probable de sepsis.

Se incubaron los cultivos a 37 °C, realizando tres lecturas en un periodo de 24 horas, anotando los tiempos del desarrollo microbiano.

RESULTADOS: Se trabajaron 557 hemocultivos pareados, de los cuales 75 fueron positivos (13%).

Los gérmenes aislados se identificaron de acuerdo a: tinción de Gram, características microscópicas y actividades metabólicas.

Se realizó una comparación de promedios de los tiempos de positividad de ambos, utilizando la prueba estadística t de Student.

Se encontró una diferencia estadística para los cocos Gram(+) y bacilos Gram (-), no así para los microorganismos no fermentadores .

CONCLUSIONES: La adición de rojo de fenol a los hemocultivos disminuye los tiempos de detección de la presencia microbiana, mejorando así la utilización de estos.

INDICE

ANTECEDENTES.....	1
JUSTIFICACION.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPOTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
POBLACION.....	28
DISEÑO.....	28
CRITERIOS.....	29
MATERIAL Y METODOS.....	30
PROCEDIMIENTO.....	33
RESULTADOS.....	42
ANALISIS DE RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES.....	54
ANEXO.....	55
REFERENCIAS.....	59

A N T E C E D E N T E S

La presencia de bacteriemia o fungemia representa la falla de las defensas del huésped, estas responden rápidamente por la influencia de los microorganismos, particularmente por la eficiencia de los fagocitos, por macrófagos y por el sistema fagocito mononuclear que puedan limpiar la sangre en cuestión de minutos u horas. Muchos de estos microorganismos son capsulados evitando así la acción de los anticuerpos específicos.(1,2)

BACTERIEMIA TRANSITORIA: Ocurre de minutos a horas, ésta es la más común y ocurre después de manipular tejidos infectados (abscesos o forúnculos) durante ciertos procedimientos quirúrgicos o procedimientos que involucran contaminación o colonización de mucosas, (por ejemplo: manipulaciones dentales, cistoscopia y endoscopia gastrointestinal), así como neumonías, meningitis y artritis séptica.(3,4)

BACTERIEMIA INTERMITENTE: Esta asociada con infecciones en sitios cerrados, como es un absceso intra abdominal, pero algunos de estos pacientes que tienen la infección localizada cursan también con neumonía u osteomielitis.

BACTERIEMIA CONTINUA: Es característica de una endocarditis o alguna otra infección endovascular (tromboflebitis supurativa, aneurism micótico), esto ocurre al principio de una brucelosis o fiebre tifoidea.

Aunque casi cualquier infección localizada puede diseminarse al torrente sanguíneo, y ser la fuente de bacteriemia o fungemia, en una cuarta parte de los pacientes con bacteriemia, no se puede determinar cual es el foco primario.

El uso de catéteres intravasculares son fuentes de bacteriemias o fungemias, esto va paralelo al uso prolongado de tratamientos con quimioterapia tanto central como periférica y por nutrición parenteral.

BACTERIEMIA Y FUNGEMIA: Son términos que se emplean para identificar la presencia de bacterias u hongos respectivamente en la sangre.(5)

SEPSIS: Es la presencia de síntomas clínicos y de datos de laboratorio sugestivos de infección, en presencia de un foco infeccioso clínicamente detectado, con o sin hemocultivos positivos.(6)

SEPTICEMIA: Es un síndrome clínico asociado con evidencias de infección aguda y falla orgánica relacionada con la liberación de mediadores del huésped, por ejemplo citocinas en circulación. Muchas veces no esta asociada con hemocultivos positivos.

Los signos y síntomas de la sepsis no son específicos. A menudo su aparición es abrupta y antes de la fiebre se pueden presentar escalofríos incontrolables, malestar, aprensión e hiperventilación y algunos pacientes tienen manifestaciones cutáneas semejantes a un

rash, embolia séptica o eritema gangrenosos. Algunos síndromes infecciosos son atípicos y pueden confundir el cuadro clínico, por ejemplo, algunos pacientes no presentan fiebre, neonatos o ancianos, pacientes que reciben terapia con corticoides o con antiinflamatorios no esteroides, y algunos de ellos pueden presentar hipotermia que es un signo de mal pronóstico.

FACTORES DE RIESGO

La condición que predispone a un individuo a una infección en el torrente sanguíneo incluye la edad, enfermedades debilitantes, uso de algunos agentes terapéuticos y algunos procedimientos primarios para restablecer o mantener la salud. Los infantes prematuros son de alto riesgo para las bacteriemias. (7)

Una lista de enfermedades que pueden asociarse al incremento del riesgo de infección en el torrente sanguíneo son: malignidades hematológicas, diabetes mellitus, falla renal que requiere de diálisis, cirrosis hepática, síndromes de inmunodeficiencias y condiciones que incluyen pérdida de la barrera normal de la piel, como quemaduras serias o úlceras por decúbito, implantación de catéteres intravasculares, especialmente los asociados a intestino y tracto genitourinario y padecimientos endoscópicos. Finalmente el uso de corticoides que alteran la respuesta inmune mediada por células, incrementa el riesgo de una infección por microorganismos intracelulares obligados.

ETIOLOGÍA MICROBIANA

Los agentes más comunes, causantes de infección nosocomial son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y no han cambiado en dos décadas. Se han visto un incremento dramático en la incidencia por *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), pero la gran mayoría de los SCN (85%) se siguen considerando como una contaminación más que una verdadera bacteriemia. Otro cambio importante es el incremento de fungemias y bacteriemias por enterococos.(8)

En niños los microorganismos causantes de bacteriemias y fungemias son similares a de adultos, pero existen algunas diferencias importantes. Las bacterias anaerobias son menos comunes en pacientes pediátricos. *Haemophilus influenzae* antes era común en niños, pero tiende a desaparecer; por el uso de la inmunización contra el *Haemophilus influenzae* tipo “b”.(2,5)

PRONOSTICO DE BACTERIEMIAS Y FUNGEMIAS

El resultado de bacteriemias depende de muchos factores, el rango de mortalidad oscila entre el 20 - 50 %.

INTERPRETACIÓN DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS

Algunas de las técnicas son evaluadas por clínicos y microbiólogos para poder dar una interpretación clínica de los hemocultivos positivos. La identificación del microorganismo aislado proporciona algunos valores predictivos. Cuando se aíslan *S. aureus*, *E.coli* y otros miembros de las Enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Candida albicans*, representan casi siempre (90%) los agente causales de la infección, sin embargo, cuando se aíslan otros microorganismos como *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.* y *Propionibacterium acnes*, raramente (5%) representan verdaderas bacteriemias. Los más problemáticos son los aislamientos de *Streptococcus* del grupo *viridans*, enterococos y SCN, que pueden causar verdaderas bacteriemias. (5,9)

ESTRATEGIAS DIAGNOSTICAS EN HEMOCULTIVOS

NÚMERO DE HEMOCULTIVOS: En pacientes adultos se toman de dos a tres hemocultivos por episodio séptico, debido a que el 95 % de bacteriemias o fungemias son detectados en el segundo o tercer hemocultivo. La obtención rutinaria de más de un hemocultivo por episodio séptico aumenta la seguridad del diagnóstico. Esto ayuda a distinguir físicamente entre la importancia clínica y los microorganismos contaminates.

TIEMPO PARA LA COLECCIÓN DE CULTIVOS: Los microorganismos que están causando infecciones en el torrente sanguíneo son rápidamente limpiados de la sangre. Las muestras se deberán tomar de preferencia antes de iniciar cualquier terapia antimicrobiana. (10,11)

Colección de productos: En los laboratorios de microbiología se emplean algunos procedimientos para asegurar que los hemocultivos sean colectados de la mejor manera, para minimizar los riesgos de contaminación. Las muestras de sangre se toman por punción de las venas periféricas y no por vía del catéter vascular.

Antes de realizar la venipunción es necesario desinfectar el tapón de goma de los frascos de los hemocultivos. El yodo no debe emplearse con este propósito, ya que puede causar deterioro de tapón. Después de seleccionar el sitio de venipunción, se aplica un torniquete en el brazo y se palpa la vena, el sitio de venipunción es desinfectado con yodo o un yodoforo, la aplicación se hace en forma circular con un diámetro final de 5-6 cm. Los efectos del antiséptico dependen del tiempo y se requiere de 1- 3 minutos para la venipunción, una vez desinfectado, el flebotomista, no debe tocar la piel. El torniquete es retirado una vez hecha la punción. (12,13)

Para prevenir contaminación se recomienda el cambio de aguja de la jeringa y la inoculación se realiza en forma ligeramente invertida, para mezclar la sangre con el caldo.

PRINCIPIO DE LA DETECCIÓN EN EL LABORATORIO

VOLUMEN DE SANGRE: El volumen adecuado de sangre para inocular es fundamental para la recuperación microbiana en pacientes pediátricos y adultos. Esto es porque el número de microorganismos presentes en la sangre del adulto es bajo, comúnmente es poco menos de 10 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC /mL.) y en algunos casos es menor de 1 UFC/mL. Para los pacientes adultos es necesario adicionar un poco más del volumen recomendado por la técnica empleada, ésto incrementa la recuperación microbiológica por arriba del 3 %; para maximizar, se recomienda tomar de 20 a 30 mL de sangre por venipunción. Para los pacientes infantes el número de microorganismos presentes por mL de la sangre es más grande, comúnmente más de 100 UFC/mL. y en algunos casos mucho mas de 1000 UFC/mL.; por lo que un menor volumen de sangre permite la recuperación microbiológica.(3,7,14-17)

No deberán rechazarse las botellas con volúmenes de sangre inadecuados, estas deberán incubarse por más tiempo para poder tener alguna recuperación microbiana.(11)

RELACIÓN SANGRE / CALDO: Al diluir la sangre en el caldo, se recomienda en lo posible tener una relación de 1:5, esto favorece la recuperación microbiológica, probablemente por la dilución de los agentes antimicrobianos y la inhibición de factores naturales de la sangre.(16,18)

Algunas botellas para hemocultivos comerciales, no contienen suficiente volumen de medio para permitir mantener la relación 1: 5 ó 1: 10, pero estos medios pueden contener suplementos que promueven la recuperación microbiológica.⁽¹⁸⁾

MEDIOS UTILIZADOS: Para las botellas de cultivos anaerobios el medio más empleado es de Soya Caseina Digerida (SCD) en caldo. Otros medios empleados para recuperar microorganismos fastidiosos incluyen al de Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con caldo peptonado, SCD y Columbia. Más medios comerciales son suplementados con combinaciones apropiadas de varios nutrientes y factores de crecimiento.

En general el SCD es adecuado para recuperar microorganismos patógenos, El BHI es bueno, porque se recuperan levaduras y algunas otras bacterias como en el SCD, el Columbia y otros caldos anaerobios son adecuados para recuperar bacterias anaeróbicas.⁽¹⁹⁾

ANTICOAGULANTES: El más comercial empleado para hemocultivos es el Polianetol Sulfonato de Sodio (SPS), que se encuentra en concentraciones que oscilan entre 0.025 al 0.050 %., además este inhibe a la lisosima, inactiva concentraciones de algunos aminoglucosidos y polimixinas, inhibe partes de la cascada del complemento y la fagocitosis. Mejora la recuperación microbiológica, y los fagocitos en la sangre cultivada probablemente no actúe en la ingestión del microorganismo, particularmente si la cascada del

complemento se encuentra inhibida; sin embargo se ha visto que inhibe el desarrollo de *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Peptoestreptococcus sp*, *Francisella tularensis* y *Moraxella catarrhalis*. En concentraciones mayores de SPS aumentan la recuperación de cocos Gram positivos y disminuyen la recuperación de Gram negativos. (19,20)

El medio de cultivo suplementando con el 1.2 % de gelatina, contrarresta el efecto inhibitorio del SPS. pero disminuye su efecto anticomplementario. Un compuesto similar es el Amino Sulfato de Sodio (SAS), este ha sido evaluado como anticoagulante para emplearse en hemocultivos, aunque este no inhibe el desarrollo de microorganismos inhibidos por el SPS. El uso del SAS da baja recuperación de *Streptococcus*, miembros de los *Bacterioideaceae* y *Eubacterium*. La detección del crecimiento microbiano es más rápido con el uso del SPS. Otros anticoagulantes comunes son la heparina, Etilen Diamino Tetra Acético (EDTA) y citrato de sodio, pero nunca se han empleado para hemocultivos. Una excepción es el empleo de EDTA en el método de lisis centrifugación. (21)

AGENTES REMOVEDORES DE ANTIMICROBIANOS: Una gran variedad de productos se venden con el propósito de eliminar el efecto antimicrobiano en la sangre de pacientes que reciben terapia antimicrobiana sistémica. Las botellas que contienen estos productos tienen una mejor recuperación microbiana. El mecanismo de acción

exacto de estos productos, aun es desconocido.

Los sistemas BACTEC 900 y Bact Alert usan botellas que contienen estos productos para aumentar la recuperación microbiológica, el sistema ESP de (Difco) incluye una botella semejante. Las botellas usadas en Bact Alert y BACTEC 900 recuperan más microorganismos patógenos que las botellas normales. En pacientes que reciben antibióticoterapia se recuperan más microorganismos por episodio séptico..(22)

CONDICIONES ATMOSFÉRICAS: Para los sistemas automatizados las botellas para hemocultivos son fabricadas con un cuidadoso control atmosférico. Las botellas aeróbicas generalmente contienen un ambiente atmosférico con cantidades variables de CO₂ . Las botellas anaeróbicas contienen una atmósfera compuesta por CO₂ y nitrógeno.(23)

En particular *P. aeruginosa* y levaduras patógenas son estrictamente aeróbicas y no es posible cultivarlas en botellas de hemocultivos con contenido insuficiente de O₂. En sistemas automatizados las botellas para anaerobios no deben ser ventiladas o la recuperación de anaerobios estrictos será muy complicada.(24)

AGITACIÓN DE LAS BOTELLAS: La agitación de las botellas incrementa la recuperación microbiológica para microorganismos aeróbicos, porque incrementa la concentración de O₂ en el caldo. Se

han usado diferentes métodos y velocidades de agitación pero esto no difiere para la recuperación microbiológica. Las botellas para los anaerobios no contienen O_2 , ó lo contienen en poca concentración. Las botellas para anaerobios no requieren agitación al igual que las botellas para micobacterias.(25)

DURACIÓN DE LA INCUBACIÓN: Con los métodos manuales, el desarrollo microbiológico es detectado por un examen microscópico de las botellas con subcultivos ciegos o terminales. Después de la detección microbiológica se hace difícil después del segundo al tercer día de incubación por la hemólisis general, las evidencias de desarrollo dificultan la detección o quizá se encuentra ausente. Las botellas procesadas en forma manual deben ser incubadas hasta por 7 días con un subcultivo terminal.(26)

SUBCULTIVOS: En sistemas manuales los subcultivos ciegos funcionan en un tiempo arbitrario durante la incubación en la ausencia de evidencia macroscópica de desarrollo. Los cultivos terminales funcionan al finalizar el periodo de incubación en la ausencia de desarrollo microbiano. Los subcultivos ciegos o terminales no son necesarios cuando se emplean sistemas manuales que incluyen una pared de agar. Para los sistemas automatizados no es necesario realizar subcultivos ciegos o terminales al igual que para los cultivos de microorganismos anaerobios.(27)

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN: Una vez inoculada la sangre en las botellas para hemocultivo, ésta no debe estar en condiciones adversas que pueda afectar la recuperación microbiológica. Los hemocultivos que trabajan por sistemas de monitoreo continuo pueden estar a una temperatura entre 35 y 37° C. Los sistemas manuales deben incubarse a 37° C y los subcultivos deben incubarse a una temperatura apropiada para la sospecha del patógeno.(41)

SISTEMAS DE HEMOCULTIVOS

SISTEMAS DE DETECCIÓN MANUAL: Consisten en botellas con caldo y con un espacio vacío, la concentración de O₂ es incrementada con la ventilación de las botellas. Después de la inoculación las botellas pueden ser incubadas con o sin agitación y periódicamente examinadas para observar la evidencia macroscópica de desarrollo. Esto puede ser hemólisis, turbiedad, producción de gas, chocolatización de la sangre y la presencia de colonias visibles o una película que se desarrolla en el menisco del medio líquido. En estos son necesarios los subcultivos ciegos o terminales.

Los sistemas manuales son muy laboriosos para los laboratorios que procesan grandes volúmenes de hemocultivos, estos son inspeccionados diariamente para observar la evidencia de desarrollo y la realización de los subcultivos.(28)

BOTELLAS RUIZ CASTAÑEDA: Es un sistema que incorpora una pared que contiene medio de agar, fue muy popular durante la década pasada. Comercialmente se incluyen las versiones del Septi-Chec y Opticult (ByD). Algunas botellas anaeróbicas son inoculadas, se les ha agregado a las botellas esta pared de agar y son temporalmente invertidas para permitir que la mezcla de la sangre y el caldo fluyan dentro del dispositivo y cubran el medio de agar. Las botellas y la pared son revisadas dos veces al día para ver la evidencia macroscópica del desarrollo, las botellas para anaerobios de este sistema no tienen la pala agregada.

Estas botellas tienen la ventaja de no requerir ventilación cuando se incuban, proporcionan una alternativa más de detección de desarrollo microbiano, proporcionan un aislamiento fácil de las colonias para la identificación final y de la susceptibilidad. Para los laboratorios que procesan altos números de hemocultivos tienen mucho uso práctico y este sistema es relativamente barato. (28,41)

SISTEMA OXID-SIGNAL: (Oxoid USA, Columbia, Mo): Este sistema es el más usado en Estados Unidos, es un hemocultivo aeróbico. Después de que se inocula la botella, un dispositivo “señal”, que consiste en una aguja larga que contiene un mango plástico es agregado a la botella.

El desarrollo de los microorganismos y la producción de gas liberado en el espacio atmosférico, la presión en la botella aumenta forzando que la mezcla de caldo y sangre suban a través del dispositivo dentro

de un reservorio por arriba del mango plástico. Este es otro tipo de evidencia macroscópica del desarrollo microbiano. La carencia de botellas anaeróbicas es una desventaja importante para este sistema.⁽²⁵⁾

SISTEMA ISOLATOR: Es un sistema manual diferente, donde la base no es un caldo, es la lisis-centrifugación. Es la única versión comercialmente disponible (Wampole Laboratories Crambory N.J.) los tubos isolator contienen EDTA como anticoagulante, saponinas como agente lisante y un compuesto fluorocarbonado que actúa como amortiguador durante la centrifugación. Después de inoculada la sangre en el tubo, las células son lisadas por las saponinas. Los tubos son centrifugados y el sobrenadante es descartado. El sedimento es removido de los tubos para ser inoculado en medios sólidos adecuados. Las características fundamentales y las ventajas y desventajas del Isolator pueden funcionar como un excelente método para recuperar levaduras patógenas y hongos dimórficos presentes en la sangre. Es un método aceptable para la recuperación de bacterias patógenas comunes y patógenos fastidiosos como *Bartonella spp.*, es un método excelente para recuperar microorganismos anaerobios. Sin embargo existen altos rangos de contaminación.

SISTEMAS DE DETECCIÓN AUTOMATIZADA: El procedimiento de los hemocultivos es más eficiente y algunos fabricantes han desarrollado una variedad de equipos automatizados en los últimos 20 años.⁽⁴¹⁾

SISTEMA BACTEC RADIOMÉTRICO: Fue el primer sistema automatizado en el mercado para los hemocultivos, (BACTEC Becton Dickson). Este sistema detecta el desarrollo microbiano monitoreando la concentración de CO₂ presente en la botella. Los metabolitos precursores de desarrollo se encuentran marcados con C¹⁴ presente en el caldo, el desarrollo microbiano libera C¹⁴O₂ en la botella y el espacio atmosférico es periódicamente muestreado.⁽²⁶⁾

Esta cualidad está relacionada con el índice de crecimiento, un índice de desarrollo excedido es considerado un umbral para dar una evidencia de desarrollo microbiano y se realizan frote para Gram y subcultivos de la mezcla de sangre y caldo. Aunque este sistema puede ser reemplazado en su mayor parte por otros sistemas automatizados, el modelo 460 continua siendo empleado para la detección de micobacterias. La Oficina de Drogas y Alimentos (FDA) promueve a los métodos automatizados para realizar la drogossensibilidad de micobacterias.⁽²⁸⁾

SISTEMA BACTEC NO RADIOMÉTRICOS: En la década de los ochentas Beckton Dickenson introduce los equipos BACTEC no radiométricos, estos son similares a los sistemas radiométricos, éste sistema detecta el desarrollo microbiano monitoriando la concentración de CO₂ presente en las botellas, mediante espectroscopia de infrarrojos. Este sistema requiere de menos tiempo para el monitoreo

SISTEMA Bio-Argos: (Sanofi Diagnostic Pasteur) Este sistema es similar al BACTEC no radiométrico, este es de monitoreo continuo, para detectar el desarrollo microbiano emplea igual espectroscopia infrarroja que determina la producción de CO₂. Es completamente automatizado.⁽²⁹⁾

SISTEMAS DE MONITOREO CONTINUO: Son avances técnicos de mayor trascendencia para los hemocultivos en los últimos 20 años. Los sistemas de monitoreo continuo difieren de los otros sistemas automatizados en varios puntos: Estos registran las botellas en base continua, normalmente es una cada 10 minutos.

Los datos colectados de este monitoreo son transmitidos a una microcomputadora, la cual los almacena y los analiza. Estos datos son colectados por botella y por día, cuando estos son suficientes son evaluados por un algoritmo, para poder determinar el desarrollo microbiano. Estos equipos incorporan el sistema de detección, incubación y agitación en la misma unidad.⁽²⁶⁾

SISTEMA BacT/Alert: (Organon Teknika Corp). Es el primer sistema de monitoreo continuo comercial con botellas que tienen un sensor sólido, que cambia de color al incrementarse el CO₂ en el caldo de cultivo.

Una luz intermitente y un diodo sensor son incorporados en la base de cada celda en donde se encuentra la botella, el cambio de color aumenta la luz, que es reflejada en el sensor y esta es cuantificada por

que causa un incremento en el voltaje. Estas señales son recogidas por la microcomputadora y son analizadas por un algoritmo, los algoritmos reconocen tres criterios para dar la evidencia de desarrollo microbiano, inicia la lectura cuando esta rebasa un umbral limite, un incremento lineal de CO₂ y un incremento en la producción de CO₂.

Este sistema es usado para recuperar *Brucella melitensis* y otras brucelas en las botellas aeróbicas, el tiempo de detección del desarrollo microbiano fue aproximadamente de tres días, también se han podido recuperar *Campylobacter upsaliensis*, con botellas normales después de 4-8 días de incubación. Otros gérmenes aislados son: *Coccidioides immitis* y *Bartonella henselae*.⁽³⁰⁾

SISTEMA ESP: Fue el tercer sistema de monitoreo continuo en el mercado, este difiere de otros sistemas por que no incluye un sistema de agitación para las botellas usadas para la recuperación de microorganismos anaeróbicos. En las botellas empleadas para la recuperación de microorganismos aerobios el caldo está formulado con soya caseina peptonada y para las botellas anaeróbicas es la proteosa peptonada.⁽⁴¹⁾

SISTEMA VITAL: (Bio Merieux . Vitek): Fue desarrollado en Francia, este sistema aun no tiene una acreditación de la FDA. Es diferente a otros sistemas por algunas cosas. Primero: Es el único que emplea un líquido fluorescente que se encuentra en el caldo, el cual puede detectar la producción de iones hidrogeno, electrones y radicales libres producidos por el desarrollo microbiano. El algoritmo de la

computadora monitorea la disminución de la fluorescencia. Segundo: Las botellas son colocadas en cajones largos. Tercero: Las botellas son agitadas de manera sinusoidal. Existen reportes donde afirman que con este sistema existe un decremento en la recuperación de microorganismos patógenos.⁽³¹⁾

OXOID: Sistema Automatizado que Investiga Septicemias. (o.a.s.i.s.). En 1994 se introduce al mercado este sistema, es lo más reciente en sistemas automatizados de monitoreo continuo. Es similar al ESP, detecta el desarrollo en forma manométrica, la producción de gas se monitorea con la reflexión de un rayo láser.

Para la detección de los microorganismos que causan invasión al torrente sanguíneo, normalmente se emplean los hemocultivos con todas las variantes que ya se han mencionado para este fin, donde desarrollan bacterias patógenas aerobias y anaerobias, hongos, micobacterias y algunas bacterias fastidiosas.⁽⁴¹⁾

BACTERIAS ANAEROBIAS: Estas se presentan en gran variedad y algunas de ellas son miembros de la flora bacteriana normal, localizándose en sitios no estériles del organismo, como lo es la orofaringe, tracto gastrointestinal, genitales femeninos y la piel. La invasión al torrente sanguíneo ocurre cuando la integridad de estos sitios de residencia son dañados.

El primer caso de bacteriemia causado por bacterias anaerobias fue documentado en 1970, en donde un hemocultivo para anaerobios se introdujo en el aislamiento de rutina. Estos casos representan 10 - 15% del total de los aislamientos. La frecuencia de bacteriemia por bacterias anaerobias en algunos lugares es muy baja, por lo cual no se incluyen medios especiales para su aislamiento, aunado a esto, algunos pacientes que cursan con bacteriemia por gérmenes anaerobios pueden tener hemocultivos negativos.⁽³²⁾

Algunas investigaciones sugieren que la inoculación de hemocultivos anaeróbicos mejoran la recuperación de algunos microorganismos facultativos como el *Streptococcus pneumoniae*.

El espectro de bacterias anaerobias productoras de bacteriemia es reducido, los géneros identificados son: *Bacteroides* que van del 45 - 75% de los aislamientos, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Clostridium*, *Propionibacterium* y *Peptostreptococcus* forman el resto. Algunos aislamientos se encuentran asociados con algún síndrome clínico específico. Para *Bacteroides sp.* a menudo se asocia con infecciones intraabdominales y *Peptostreptococcus sp.* se asocia más con una infección ginecológica.

El diagnóstico de bacteriemia por bacterias anaerobias no es sencillo.

En los medios convencionales donde el desarrollo microbiano se detecta por visibilidad, el examen macroscópico es negativo, además la resiembra en placa para anaerobios no es útil. Los medios bifásicos no funcionan bien para su recuperación. El sistema que mejor funciona para este fin es el de lisis centrifugación, donde parte de la muestra se inocula en placas para anaerobios. (33)

HONGOS: Los patógenos fúngicos son agentes de una gran variedad de infecciones, incluyendo fungemia. Los principales factores de riesgo para una infección micótica incluyen: inmunosupresión, uso de antibióticos de amplio espectro, empleo de catéteres centrales. Datos actuales sugieren que la fungemia tienen una mayor prevalencia que la bacteriemia por anaerobios. Anteriormente los organismos asociados con infección invasiva incluían a *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus sp*, *Blastomyces dermatitidis* y raramente otros. En la actualidad la lista es larga, donde se incluyen a hongos y levaduras saprófitas.(31)

Algunos estudios han demostrado que la incubación aeróbica del medio convencional mejora la recuperación de los hongos. La temperatura óptima para su desarrollo varía de un organismo a otro, generalmente los hongos filamentosos desarrollan entre 27 a 30°C y los levaduriformes lo hacen a 37°C. La duración necesaria es de 2 a 3

días y para los dimórficos es de 3 semanas.

Se han empleado una gran variedad de medios para mejorar su desarrollo. El medio bifásico es muy empleado para la recuperación de cualquier especie y el sistema de lisis centrifugación es el más utilizado para la recuperación de hongos dimórficos.⁽³⁴⁾

Un nuevo patógeno que causa infección del torrente sanguíneo es *Malassezia furfur*, este hongo requiere para su desarrollo de ácidos grasos, por lo cual el medio empleado se deberá suplementar con éstos.

En el caso de aislamiento de hongos considerados como contaminantes ambientales, por ejemplo: *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, etc., es necesario determinar la relevancia que tiene dicho aislamiento con una minuciosa evaluación clínica del paciente.⁽³⁴⁾

MICOBACTERIAS: Al incrementarse el número de pacientes con infección de VIH, éstos tienen alto riesgo de padecer tuberculosis (Tb) sintomática, pero algunos de ellos tienen riesgo de padecer una infección diseminada por micobacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis*, la de mayor predominio es *M. avium*.

En más del 40 % de los pacientes VIH positivos con Tb extrapulmonar, con cuentas por debajo de 200 linfocitos CD4 / ml, tienen cultivos positivos para micobacterias y muy raramente estas son *M. tuberculosis*.⁽³⁵⁾

Ocasionalmente, en pacientes que cursan con alguna inmunosupresión, incluyendo inmunodeficiencias combinadas, terapia con esteroides, citotóxicos o quimioterapia, etc., pueden desarrollar alguna micobacteriosis diseminada causada por micobacterias atípicas.

Las técnicas de detección de micobacterias por los laboratorios son: microscopia, cultivos y la determinación de algunos productos de las micobacterias. La técnica de Buffy Coat, puede facilitar su presencia.⁽⁴⁵⁾

Para los aislamientos de las micobacterias que causan bacteriemia, se requiere de 10 a 15 ml. de sangre en medios de BHI, TSA, o *Brucella*. Algunos medios que mejoran la recuperación de micobacterias son: TSA suplementado con caldo dextrosa cerebro y el 7H11 agar con caldo BHI.⁽³⁶⁾

Las micobacterias son microorganismos intracelulares, por lo cual es necesario lizar las células para tener una mejor recuperación, por lo que se aconseja emplear la técnica de lisis centrifugación. En el medio Myco/Flytic, en el que puede inocularse directamente la sangre, liza a las células, por lo cual no requiere del uso del isolator.⁽³⁷⁾

No en todos los pacientes con infección diseminada se puede detectar bacteriemia, es necesario realizar otras técnicas alternativas con otros tipos de especimen, donde se incluyen estudios histológicos y cultivos para micobacterias.⁽³⁵⁾

ORGANISMOS FASTIDIOSOS Y RAROS: Estos no desarrollan en los hemocultivos procesados de manera usual, para su recuperación se incluyen medios suplementados, mejor instrumentación y diferentes condiciones de incubación.

Brucella sp.: La brucelosis es una enfermedad común en algunos países. este microorganismo es considerado como fastidioso; para su recuperación se requiere de medios especiales y períodos de incubación largos de 7 a 20 días.

Este organismo es intracelular y para mejorar su recuperación se recomienda el uso de lisis centrifugación e inocular en cualquier sistema, siendo los bifásicos los más empleados, al igual que los sistemas automatizados, aunque la detección de estos últimos puede requerir de subcultivos ciegos.⁽³⁸⁾

Campylobacter sp.: Han sido aislados en muy raras ocasiones, en medios convencionales, se ha recuperado solo por cultivos ciegos en medios debidamente suplementados y el tiempo de recuperación es de 4 a 7 días.

Legionella sp.: No hay muchos casos documentados de bacteriemia por *Legionella*, algunos de estos se han aislado de medios bifásicos suplementados con caldo proteosa peptona, los cuales también requirieron de subcultivos ciegos en medios suplementados.

Mycoplasma sp.: Se encuentra asociado con una variedad de enfermedades, las de origen respiratorio causadas, por *M. pneumoniae* y en infecciones del tracto genital, causadas por *M. hominis* y *Ureaplasma urealiticum*.

El aislamiento de *M. hominis* en sangre de mujeres con fiebre post parto va seguido generalmente de un padecimiento ginecológico, pero el aislamiento de *Mycoplasma* en otros padecimientos es raro. Se requieren de subcultivos en medios específicos para su identificación. Es posible que este organismo sea inhibido por el SPS, por lo que se sugiere que se suplemente el medio con gelatina.⁽³⁹⁾

MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS AISLADOS DE LOS HEMOCULTIVOS

Con los sistemas de monitoreo continuo para los hemocultivos se ha reducido el tiempo de detección en una forma importante. Pero aún no se han documentado métodos o sistemas que disminuyan el tiempo para la identificación de los organismos aislados.⁽⁴⁰⁾

En la actualidad existen diferentes medios y métodos empleados para el aislamiento e identificación de los microorganismos responsables de estos padecimientos. Hasta julio de 1991, en el Hospital Infantil de México “ Federico Gómez “, se empleó el medio bifásico de Ruiz Castañeda, constituido por agar y caldo soya tripticasa.

A partir agosto del mismo año se emplea el medio Columbia, también bifásico, al cual se le adiciona un polienriquecimiento, tanto al medio sólido como al líquido, con el objeto de recuperar el número mayor de microorganismos altamente exigentes. Además al caldo se le adiciona polianetol sulfonato de sodio, que funciona como anticoagulante, así como un inhibidor del complemento y la lisozima e interfiere con la fagocitosis e inactiva a los aminoglucósidos.⁽⁴²⁾

METABOLISMO MICORBIANO

Los microorganismos fermentadores degradan los hidratos de carbono (glucosa) inicialmente a ácido pirúvico y posteriormente a varios ácidos mixtos (succínico, láctico, fórmico, acético). Los no fermentadores, cuando desarrollan en medios con hidratos de carbono se producen reacciones neutras o ligeramente alcalinas.

Para detectar la producción de estos ácidos o bases se han empleado indicadores de pH adicionados a los medio en placa, que se emplean para aislar e identificar a los microorganismos^(43,44).

JUSTIFICACIÓN

La bacteriemia puede preceder a una infección sistémica grave y una oportuna detección y una buena identificación de los microorganismos involucrados en el proceso, son cruciales para establecer un tratamiento temprano y específico.

La participación del laboratorio de bacteriología es fundamental e imprescindible para establecer la etiología microbiana.

En la actualidad existen diferentes técnicas y equipos empleados para detección y recuperación de los microorganismos involucrados en los procesos sépticos que tienen la finalidad de reducir el tiempo de detección, con la desventaja de su elevado costo, tanto del equipo empleado, como de los reactivos requeridos.

Hasta el momento el método más empleado en nuestro hospital para este fin, es el hemocultivo en medio bifásico, trabajado de forma manual por los laboratorios de bacteriología, con el único inconveniente que los tiempos de positividad de desarrollo microbiano pueden ser muy prolongados. (47,48).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿ Se podrá disminuir el tiempo de detección del desarrollo microbiano en hemocultivos, al mismo costo? ^(48,49)

HIPÓTESIS

Si los microorganismos que crecen en hemocultivos bifásicos, trabajados en forma manual producen metabolitos ácidos o alcalinos durante su desarrollo, entonces podran ser detectados con indicadores de pH y manifestar tempranamente su presencia. ^(48,49)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Modificar el hemocultivo bifásico tradicional (**HBT**) con la adición de un indicador de pH, para minimizar el tiempo de detección de desarrollo microbiano. ^(48,49)

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el cambio de pH al crecimiento microbiano, en el hemocultivo bifásico modificado.
- 2.- Seleccionar el indicador de pH que detecte más tempranamente la presencia de microorganismos.
- 3.- Comparar el tiempo de detección entre el hemocultivo bifásico tradicional (**HBT**) y el modificado (**HBM**).
- 4.- Aislar e identificar los agentes involucrados en los procesos sépticos

P O B L A C I Ó N: Setenta y cinco hemocultivos positivos, provenientes de los pacientes internados en el Hospital Infantil de México “ Federico Gómez “.

D I S E Ñ O_(47,48): El estudio es experimental, por temporalidad prospectivo, longitudinal, comparativo y abierto.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. -Hemocultivos pareados.
2. -Igual volumen de la muestra en ambos hemocultivos.
3. - Provenientes de pacientes hospitalizados del Hospital Infantil de México “Federico Gómez “,
- 4.- Correctamente identificados con el nombre completo del paciente.
- 5.- Indicación del día y la hora de la toma del producto.
- 6.- Diagnóstico probable de sepsis_(48,49).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- 1.- Pacientes que estén recibiendo terapia antimicrobiana.
- 2.- Con diagnóstico clínico de sepsis viral_(48,49).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- 1.- Hemocultivos que presenten tiempos de positividad prolongados.
(más de 96 hrs.).
- 2.- Aislamiento de bacilos Gram positivos _(48,49).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

- Frasco vial de 50 ml.
- Tapón de goma del No. 20.
- Gárgola del No. 20.
- Jeringa de 1 y de 20 ml.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Pipeta serológica de 10 ml.
- Tubo de ensayo de 16 X 150 mm.
- Asa de siembra bacteriológica.
- Porta objetos.25 X 75 mm.
- Cajas Petri
- Frasco gotero.
- Aplicadores de madera.

EQUIPO

- Engargoladora.
- Autoclave.
- Incubadora de CO₂
- Balanza analítica.
- Gradilla.
- Mechero Bunsen.

REACTIVOS COMERCIALES

- Agar Columbia (DIFCO).
- Caldo Columbia (DIFCO).
- Rojo de fenol (NATIONAL ANILINE DIVISION).
- Azul de bromotimol. (SIGMA)
- Polianetol sulfonato de sodio (SIGMA).
- Polienriquecimiento (BIOXON).
- Sangre de carnero (HEMO-PROVEDORES).
- Peróxido de hidrógeno. (LABORATORIO LAITZ)
- Antisueros para tipificación de *Streptococcus* (Oxoid).
- Antisueros para tipificación de *Brucella* (INDRE).
- Sistema de identificación API 20 E, 20 NE y 20C AUX (BioMérieux).
- Tiras reactivas para la determinación de oxidasa (MERCK).
- Discos de diferenciación de optoquina (DIFCO).
- Discos de diferenciación de bacitracina (BBL).
- Prueba de PYR, para la identificación de *Enterococcus* (PLM Microbiological).

REACTIVOS PREPARADOS EN EL LABORATORIO

- Agua destilada.
- Solución salina isotónica.
- Gelosa sangre.
- Gelosa chocolate.
- Gelosa tergitol.
- Gelosa DNAsa.
- Plasma sanguíneo humano.
- Pruebas bioquímicas en tubo de: Citrato de Simons, Medio de Ureasa, Kligler, MIO, LIA, Bilis esculina, Leche tornasol, Cloruro de sodio al 6.5%.,
- Caldo manitol.
- Colorantes Gram.
- Azul de O-toluidina.
- Reactivo de Ehrlich.

PROCEDIMIENTO

PREPARACION DEL MEDIO COLUMBIA

AGAR

- Pesar 44g del medio deshidratado y disolver en 100 ml. de agua destilada, aforar a 1 000 ml.
- Calentar a ebullición por un minuto.
- Verter 10 ml. del medio a 50°C en frascos vial de 50 ml.
- Tapar con tapón de goma y sujetar con cinta testigo.
- Esterilizar, en autoclave a 120°C 15 lb/ in² por 15 minutos.
- Adicionar, en condiciones de esterilidad a cada frasco 0.1 ml de polienriquecimiento cuando el medio se encuentre entre 30 - 45°C, agitar ligeramente para su incorporación uniforme.
- Colocar los frascos en posición horizontal hasta que solidifique.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Descartar los frascos que presenten desarrollo microbiano.

CALDO

- Pesar 35g. del medio deshidratado y disolver en 100 ml. de agua destilada, aforar a 1 000 ml.
- Pesar 200 mg. de polianetol sulfonato de sodio y adicionarlo al caldo, agitar para su disolución total.
- Verter 10 ml. del caldo en tubos de 16 X 150 mm.
- Tapar con tapón de algodón.
- Esterilizar en autoclave a 120°C 15 lb/ in² por 15 minutos.
- Adicionar, en condiciones de esterilidad, el caldo al frasco vial que contiene el agar inclinado.
- Colocar los frascos en posición horizontal por 15 minutos.
- Incubar a 37°C, en posición vertical, por 24 horas.
- Descartar los frascos que presenten desarrollo microbiano.
- Desprender la cinta testigo, cuidando de no abrir el frasco.
- Colocar la tapa de aluminio No. 20 en la boca del frasco
- Engargolar en forma manual.

SELECCIÓN DEL INDICADOR

- Preparar dos lotes del medio Columbia, adicionando 0.25 g/l del indicador de pH.
 - a) Un lote es preparado con rojo de fenol (Fenolsulfonaftaleina) y
 - b) Otro con azul de bromotimol. (3', 3'' Dibromotimol sulfonaftaleina) (47).
- Inocular 1 ml. de sangre de carnero estéril a cada frasco.
- Preparar una suspensión con solución salina isotónica, con los siguientes microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae* tipo "b", *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolítico grupo "A", *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus sp*, *Bacilos coryneiformes*, *Listeria sp*, *Brucella melitensis*), a una concentración equivalente al 0.5 del tubo de MacFarland.
- Inocular un frasco de cada lote con 0.1 ml de la suspensión de cada microorganismo.
- Colocar los frascos en posición horizontal por 15 minutos.
- _ Incubar a 37°C en posición vertical, realizar revisiones visuales cada hora.
- Anotar la hora del cambio del indicador y / o la formación de colonias.

TOMA DE PRODUCTO:

- Preparan dos lotes de hemocultivos, uno adicionado con el indicador, otro en condiciones normales.
- Solicitar al médico del servicio de urgencias del Hospital Infantil de México Federico Gómez, inocule ambos frascos con un mililitro de sangre. Agitando suavemente para mezclar con el caldo.
- Incluir en la solicitud del estudio: nombre completo del paciente, fecha y hora de la toma, volumen de muestra y diagnóstico.
- Colocar el frasco del cultivo posición horizontal por 15 minutos.
- Incubar por separado a 37°C en posición vertical.
- Revisar 2 a 4 veces al día, observar el viraje del medio y/o la formación de colonias.
- Anotar la hora de la detección.

AISLAMIENTO DEL AGENTE MICROBIANO

Cuando se ha detectado un hemocultivo positivo se procede de la siguiente manera:

- Agitar suavemente la botella para resuspender la sangre y los microorganismos.
- Retirar 0.4 ml. de sangre.
-
- a).- Colocar una gota sobre un portaobjetos.
- Dejar secar y fijar a la flama.
- Teñir con la técnica de Gram.
- Observar al microscopio.
-
- b).- Con el resto de la muestra (0.3ml). Colocar 0.1ml, en placas de gelosa sangre, chocolate y tergitol.
- Estriar para obtener colonias aisladas.
- Incubar a 37°C por 24 horas en atmósfera CO₂.

IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE MICROBIANO

- Transcurrido el tiempo de incubación de las placas, revisar una por una, para observar las características de las colonias.
- verificar si existe el desarrollo de uno o varios gérmenes, y
- realizar tinción de Gram de dichas colonias.

IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS

- Cuando existe desarrollo en las tres placas empleadas (gelosa sangre, chocolate y tergitol), proceder a:
- Tomar con una asa bacteriológica una colonia.
- Inocular con ella los cinco tubos para pruebas bioquímicas (MIO, Kligler, LIA, Urea y citrato de Simons).
- Incubar a 37°C por 24 hrs. en atmósfera de CO₂.

INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS_(43,44)

Si las pruebas bioquímicas revelan la presencia de un *Enterobacter sp.*, en necesario realizar la prueba de la DNAsa.

- Tomar un inóculo de la colonia y sembrar por picadura en la placa de agar DNAsa, en la misma placa inocular las cepas controles (*E. coli*, negativo y *Serratia sp.* positivo).
- Incubar a temperatura ambiente por 24 hrs.
- Cubrir la placa con azul de ortotoluidina por cinco minutos.
- Retirar el exceso y leer a trans-luz.
- Lectura e interpretación: formación de halo rosa alrededor de la colonia, por lo tanto reportar: *Serratia sp.*
- Si la prueba bioquímica revela la presencia de una *Salmonella* o *Shigella*, aglutinar con sueros específicos para tipificación.

- Si la prueba bioquímica revela la presencia de un bacilo no fermentador, es necesario montar el sistema API 20 NE para su identificación.
- Si la prueba bioquímica no es muy clara, montar el sistema API 20 E, para la identificación de la enterobacteria_(43,44).

IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS

- Estos desarrollan sólo en los medios de agar sangre y chocolate.
- Observar la producción de hemólisis.
- Realizar la prueba de la catalasa, de preferencia de gelosa chocolate.

COCOS GRAM POSITIVOS, CATALASA POSITIVOS

- Realizar la prueba de la coagulasa y fermentación del manitol.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Realizar la lectura e interpretar las pruebas.
- Coagulasa (+), Manitol (+) : *Staphylococcus aureus*.
- Coagulasa (-) , Manitol (variable): *Staphylococcus coagulasa* negativo.

**COCOS GRAM POSITIVOS, CATALASA NEGATIVO,
α-HEMOLITICOS**

- Realizar la prueba de PYR₍₄₆₎

- **PYR (+):**

- Realizar las pruebas bioquímicas: Bilis esculina, leche azul de metileno, NaCl al 6.5 %.

Interpretar las pruebas.

- Todas positivas: *Enterococcus sp.*

- **PYR (-)**

- Resembrar en agar sangre, colocando sobre la estría un discos de optoquina.

- Incubar a 37°C durante 24 hrs, en atmósfera de CO₂.

- Lectura e identificación: Si se presenta un halo de inhibición de 10 mm, se reporta como *Streptococcus pneumoniae*. Confirmar con la prueba de coaglutinación.

- Si no se presenta halo de inhibición, se reporta como *Streptococcus viridans*.

- COCOS GRAM POSITIVOS, CATALASA NEGATIVO, β -HEMOLITICO.

- Resembrar en gelosa sangre, colocar sobre la estría un disco de bacitracina.
- Incubar a 37°C durante 24 hrs en atmósfera de CO₂.
- Si presenta halo de inhibición de 12 mm, reportar como:
Streptococcus β -hemolítico grupo “A “.
- Lectura e identificación: Si no presenta halo de inhibición, realizar la tipificación por aglutinación con antisueros específicos (Oxoid).

COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS:

- Si sólo desarrollan en gelosa chocolate, comprobar la dependencia de factor V y X, aglutinar con antisueros específicos para *Haemophilus*.
- Si el desarrollo es muy escaso a las 24 hrs, incubar otras 24 hrs.
- Si el desarrollo es escaso aglutinar con antisueros específicos para *Brucella sp.*

BACILOS GRAM POSITIVOS:

Cuando sé aíslan se reportan como posibles contaminantes y se solicita nueva muestra. Si se puede excluir el desarrollo de *Listeria sp.*

RESULTADOS

Se trabajaron 557 hemocultivos pareados, de estos 75 fueron positivos, 54 de los cuales presentaron positividad en ambos frascos, 10 solo en el **HBT**, 11 para el **HBM** y 482 negativos en ambos frascos.

De los hemocultivos positivos, se aisló y se identificó a los microorganismos. Estos fueron agrupados de acuerdo a su microscopia y tinción de Gram.

TABLA DE RESULTADOS

		HBT		
		+	-	TOTAL
HBM	+	54	11	65
	-	10	482	492
	TOTAL	64	493	557

SELECCIÓN DEL INDICADOR DE pH
ROJO DE FENOL Vs AZUL DE BROMOTIMOL

	4 Hrs.		5 Hrs.		6 Hrs.		7 Hrs.		8 Hrs.		24 Hrs.	
	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R	A	R
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/D	-/D
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+/-	-	+	-/D	+/D	+/D	+/D	+/D	+/D
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/D	+/D
<i>H. influenzae</i>	-	-	-	+/-	-	+	-	+	-	+	+/D	+/D
<i>E. coli</i>	-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-D	+/D	+/D	+/D	+/D	+/D
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-D	+/D	+/D	+/D
<i>S. β hemolitico "A"</i>	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+	+
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/D	+/D	+/D	+/D	+/D
<i>Enterococcus sp</i>	-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+/D	+/D	+/D	+/D	+/D
<i>Bacilos difteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Listeria sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Brucella mellitensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A = AZUL DE BROMOTIMOL
R = ROJO DE FENOL
D = DESARROLLO MICROBIANO
- = SIN VIRE DEL INDICADOR
+ = CON VIRE DEL INDICADOR
+/- = VIRE TENUE.

RESULTADOS

TIEMPOS DE DETECCIÓN DE GERMENES AISLADOS

No.	MICROORGANISMO <i>(COCOS GRAM (+))</i>	TIEMPO EN HRS. (CON INDICADOR) H B M	TIEMPO EN HRS. (SIN INDICADOR) H B T	DIFERENCIA
1.	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> grupo "A"	24	48	24
2.	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> grupo "A"	78	96	18
3.	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> grupo "A"	18	46	38
4.	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> grupo "B"	30	96	66
5.	<i>Streptococcus β-hemolítico</i> grupo "G"	48	72	24
6.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18	72	54
7.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	48	72	24
8.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	20	96	76
9.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18	48	30
10.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24	48	24
11.	<i>Streptococcus viridans</i>	30	50	20
12.	<i>Streptococcus viridans</i>	---	48	---
13.	<i>Staphylococcus aureus</i>	17	17	0
14.	<i>Staphylococcus aureus</i>	24	48	24
15.	<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	0
16.	<i>Staphylococcus aureus</i>	35	35	0
17.	<i>Staphylococcus aureus</i>	24	24	0
18.	<i>Staphylococcus aureus</i>	---	48	---
19.	<i>Staphylococcus aureus</i>	68	68	0
20.	<i>Staphylococcus aureus</i>	48	48	0
21.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	53	---	---
22.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	62	62	0
23.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	62	62	0
24.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	96	---
25.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	48	---
26.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	72	---	---
27.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	48	---
28.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	72	---
29.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	72	---
30.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	96	---	---
31.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	16	48	32
32.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	30	30	0
33.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	27	51	24
34.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	27	51	24
35.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	96	---
36.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	---	24	---
37.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	30	50	20
38.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	48	72	24
39.	<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	72	---	---

TIEMPOS DE DETECCIÓN DE GERMENES AISLADOS

No.	MICROORGANISMO (BACILOS GRAM (-))	TIEMPO EN HRS. (CON INDICADOR) H B M	TIEMPO EN HRS. (SIN INDICADOR) H B T	DIFERENCIA
1)	<i>Escherichia coli.</i>	48	72	24
2)	<i>Escherichia coli.</i>	26	26	0
3)	<i>Escherichia coli.</i>	72	96	24
4)	<i>Escherichia coli.</i>	12	24	12
5)	<i>Escherichia coli.</i>	96	---	---
6)	<i>Escherichia coli.</i>	4	---	---
7)	<i>Enterobacter cloacae.</i>	24	48	24
8)	<i>Enterobacter cloacae.</i>	24	24	0
9)	<i>Enterobacter cloacae.</i>	24	48	24
10)	<i>Enterobacter cloacae.</i>	24	48	24
11)	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	20	48	28
12)	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	20	20	0
13)	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	15	15	0
14)	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	---	68	---
15)	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	96	---	---
16)	<i>Proteus mirabilis</i>	24	48	24
17)	<i>Salmonella "E"</i>	24	72	48
18)	<i>Salmonella "B"</i>	---	72	---
19)	<i>Shigella sonnei.</i>	48	---	---
20)	<i>Serratia sp.</i>	24	48	24

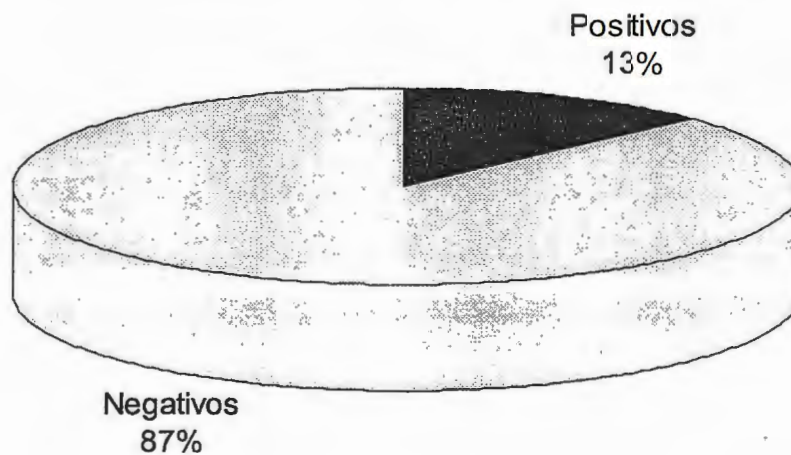
TIEMPOS DE DETECCIÓN DE GERMENES AISLADOS

No.	MICROORGANISMO (BACIOS GRAM (-) NO FERMENTADORES)	TIEMPO EN HRS. (CON INDICADOR) H B M	TIEMPO EN HRS. (SIN INDICADOR) H B T	DIFERENCIA
1)	<i>Xantomona maltophila</i>	48	48	0
2)	<i>Ochrobacter anthropi</i>	48	48	0
3)	<i>Burkholderia cepacea.</i>	48	48	0
4)	<i>Burkholderia cepacea.</i>	48	48	0
5)	<i>Burkholderia cepacea.</i>	48	48	0
6)	<i>Burkholderia cepacea.</i>	24	24	0
7)	<i>Burkholderia cepacea.</i>	96	96	0
8)	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	20	20	0
9)	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	48	48	0
10)	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	24	24	0
11)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	24	0

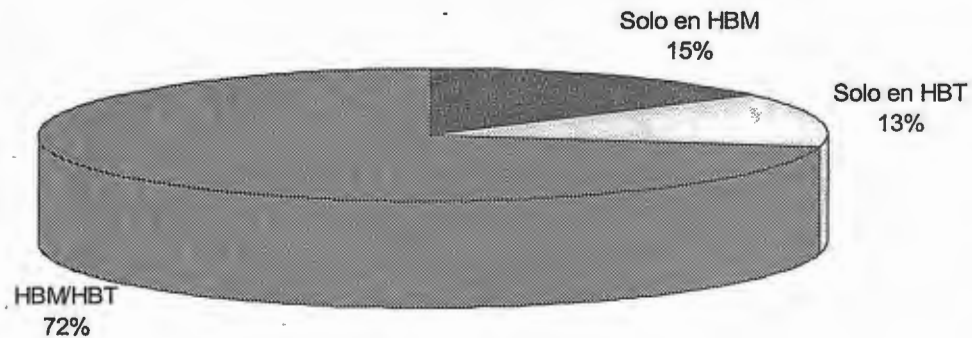
No.	MICROORGANISMO (LEVADURAS)	TIEMPO EN HRS. (CON INDICADOR) H B M	TIEMPO EN HRS. (SIN INDICADOR) H B T	DIFERENCIA
1)	<i>Candida albicans.</i>	24	24	0
2)	<i>Candida albicans.</i>	48	48	0
3)	<i>Candida famata</i>	90	---	--
4)	<i>Candida famata</i>	90	---	--

No.	MICROORGANISMOS: (COCOBACIOS GRAM (-))	TIEMPO EN HRS. (CON INDICADOR) H B M	TIEMPO EN HRS. (SIN INDICADOR) H B T	DIFERENCIA
1)	<i>Haemophilus influenzae "b"</i>	18	48	30

PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE 557 HEMOCULTIVOS

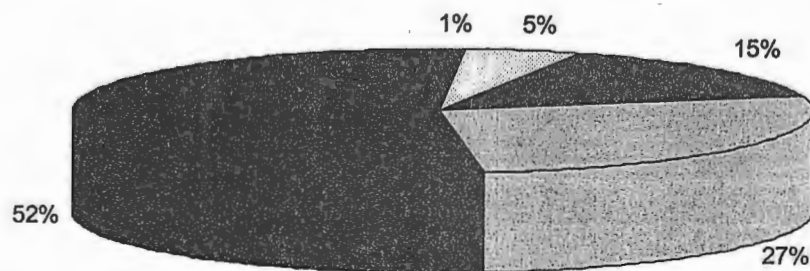


POSITIVIDAD ENTRE HBT* y HBM**



HBM** HEMOCULTIVO BIFASICO MODIFICADO
HBT* HEMOCULTIVO BIFASICO TRADICIONAL

AGRUPACION DE 75 GERMENES AISLADOS



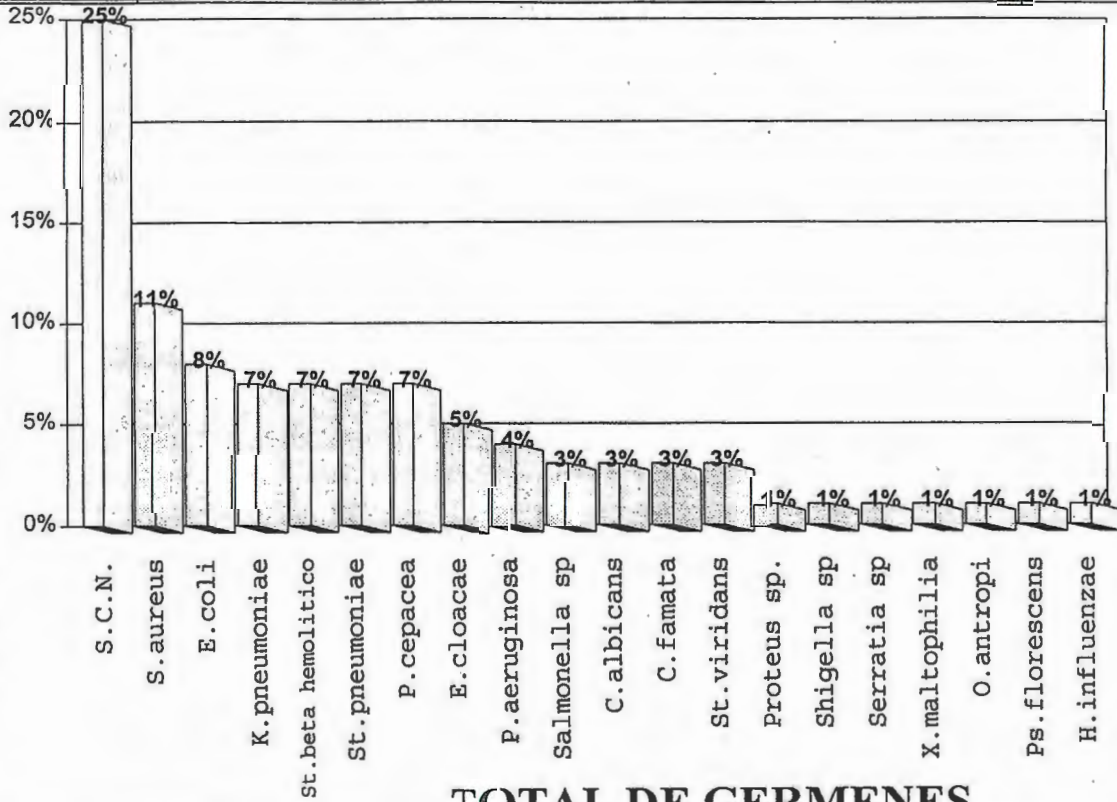
- COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS
- LEVADURAS
- BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERM.
- BACILOS GRAM NEGATIVOS
- COCOS GRAM POSITIVOS

75 GERMENES AISLADOS

T
I
E
M
P
O

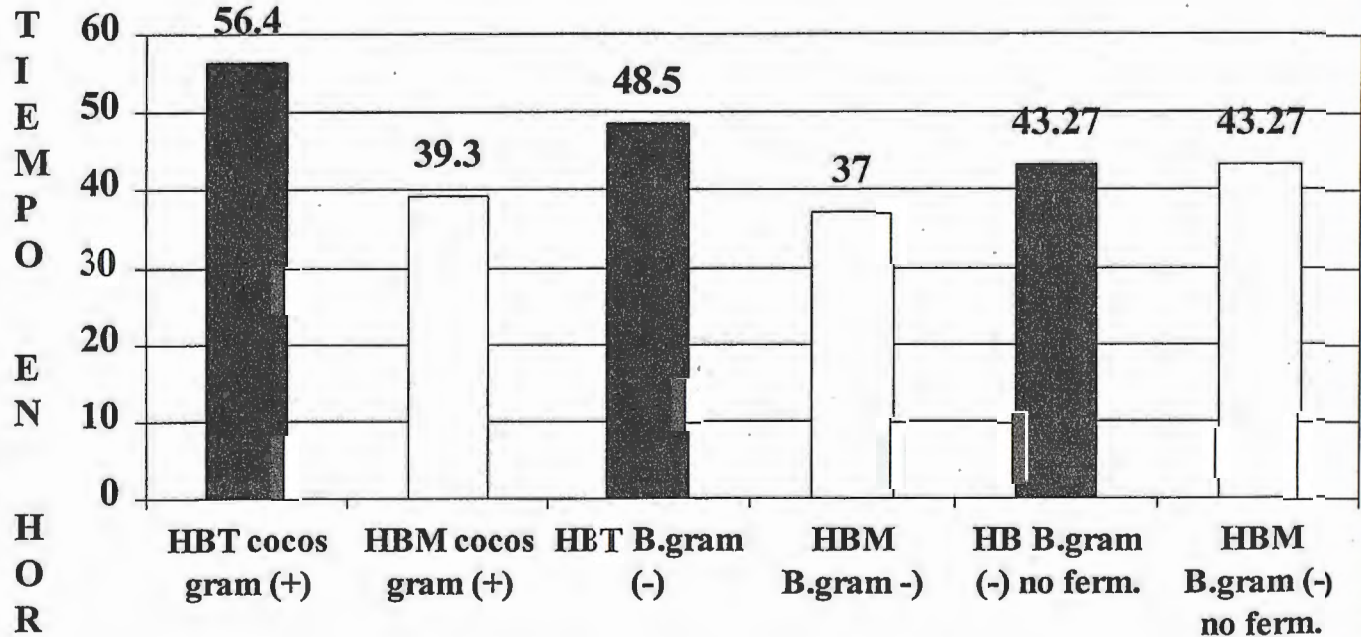
E
N

H
O
R
A
S



TOTAL DE GERMENES

COMPARACION DE PROMEDIOS DE TIEMPOS DE DETECCION



GERMENES AISLADOS

ANÁLISIS DE RESULTADOS

MÉTODO ESTADÍSTICO.

Para el cálculo de sensibilidad y especificidad, se elaboró una tabla de 2X2, colocando en ella la prueba (HBM) y contrastándola con el estándar de oro (HBT).

La sensibilidad del HBM fue del 84% y su especificidad del 98%.

Los resultados obtenidos tuvieron una distribución paramétrica, por lo cual se realizó una comparación de medias, utilizando la prueba estadística t de Student.

Para los cocos Gram positivos, se obtuvieron datos no emparejados y el resultado fue el siguiente:

T calculada = 2.4810 con 63 grados de libertad

T reportada = 2.390 con 63 grados de libertad

P < 0.01.

Para los bacilos Gram negativos, se obtuvieron datos no emparejados y el resultado fue el siguiente:

T calculada = 1.7184 con 32 grados de libertad

T reportada = 1.6973 con 32 grados de libertad

P < 0.05

Para los bacilos Gram negativos no fermentadores se obtuvieron datos emparejados y el resultado fue el siguiente:

T calculada = 0.0000 con 10 grados de libertad

T reportada = 1.8125 con 10 grados de libertad_(50,51).

P < 0.01

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe una diferencia estadísticamente significativa para los cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, esto indica que el **HBM** mejora la detección de los hemocultivos en comparación con el **HBT**.

No obstante para los bacilos Gram negativos no fermentadores, no existe una diferencia estadísticamente significativa, en este caso pareciera ser no útil el empleo del **HBM**, pero al detectar la existencia microbiana sin el vire del indicador, en ese momento se puede reportar al médico la presencia de un microorganismo no fermentador, con el fin de que este administre la antibioticoterapia para cubrir dichos gérmenes.

Para el caso de las levaduras y del *Haemophilus influenza* tipo "b", no se realizó el análisis estadístico por el número tan pequeño de las muestras recolectadas, por lo tanto no se puede decir que el empleo del **HBM** funcione mejor ó igual al **HBT**.

CONCLUSIONES

Al adicionar el indicador de pH (rojo de fenol) al hemocultivo bifásico de uso tradicional, se mejoran los tiempos de detección de la presencia microbiana, disminuyendo así el periodo del reporte de laboratorio, con el fin de iniciar más prontamente la terapia antimicrobiana en los pacientes que cursan con una bacteriemia. Por lo cual se disminuye también la estancia hospitalaria, mejorando la calidad de vida de estos.

Esta modificación prácticamente tiene el mismo costo que el requerido para el **HBT**, no requiere de equipo costoso, ni de personal especializado. Por lo tanto, la simple adición de este indicador mejora notablemente la calidad de los hemocultivos empleados en el HIMFG.

A N E X O

DIAGRAMA DE FLUJO I

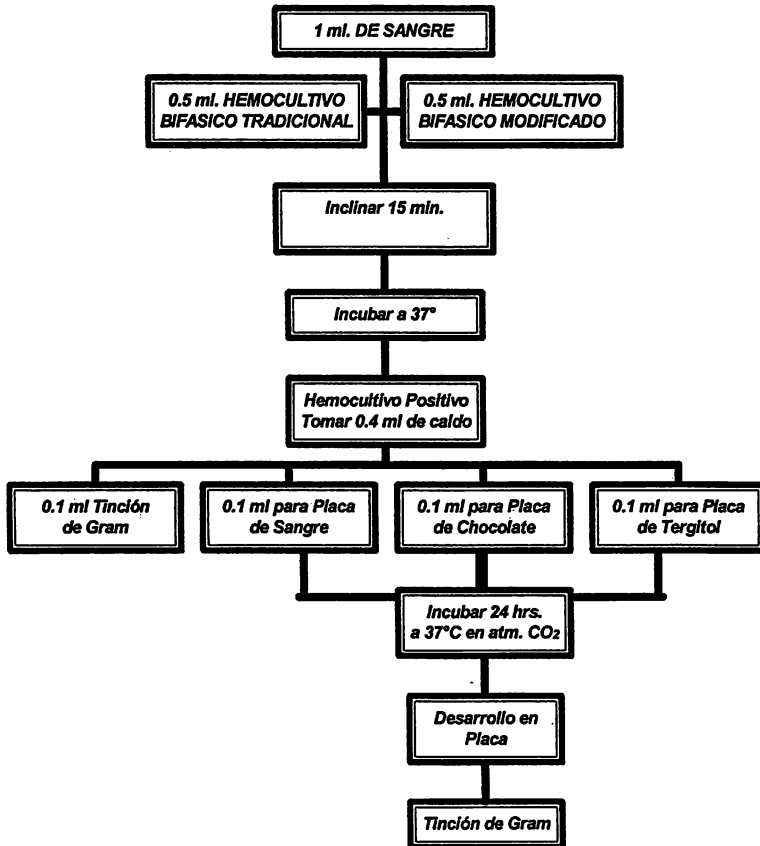
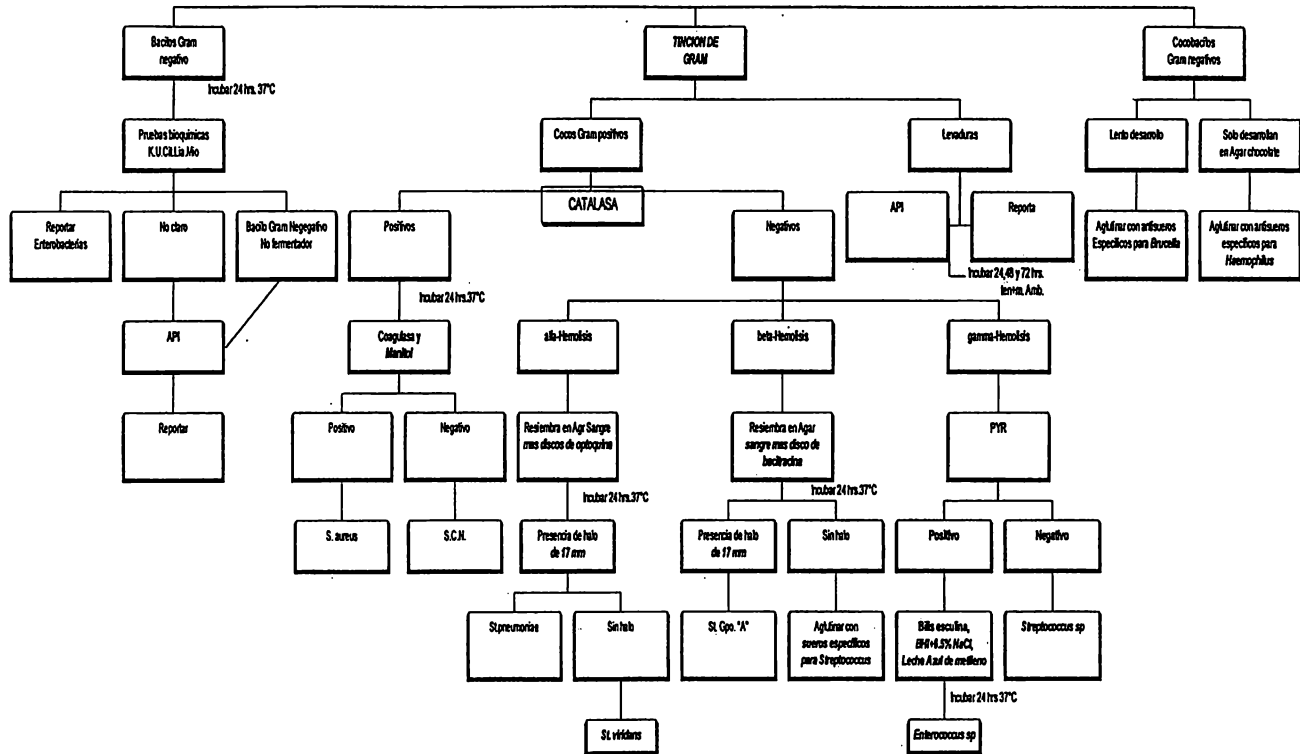


DIAGRAMA DE FLUJO II



**FORMULA APROXIMADA DEL AGAR BASE
COLUMBIA EN GRAMOS POR LITRO**

Mezcla de peptonas	10.0
Peptona biotriptasa	10.0
Peptona de músculo cardiaco	3.0
Almidón de maíz	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo de fenol	0.25
Polienriquecimiento	10.0 ml
pH final	7.3 +/- 0.2

**FORMULA APROXIMADA DEL CALDO COLUMBIA
EN GRAMOS POR LITRO**

Bacto peptona	10.0
Substrato nutritivo especial	3.0
Cloruro de L-cisteina	0.1
Bacto dextrosa	0.02
Sulfato de magnesio anhidro	0.6
Sulfato ferroso	0.02
Carbonato de calcio	0.6
Tris hidroximetil-aminometano	0.83
Cloruro de sodio	5.0
Clorhidrato de tris hidroximetil-aminometano	2.86
Polianetol sulfonato de sodio	0.025
Polienriquecimiento	10 ml.

**FORMULA APROXIMADA EN GRAMOS POR LITRO
DEL POLIENRIQUECIMIENTO**

Vitamina B-12	0.01
L-glutamina	10.0
Adenina	1.0
Clorhidrato de guanina	0.03
Ác. P-aminobenzóico	0.013
L-cistina	1.10
Glucosa	100.0
Nucleosido de Difosfopiridina oxidasa	0.25
Cocarboxilasa	0.1
Nitrato férrico	0.02
Clorhidrato de tiamina	0.003
Clorhidrato de Cisteina	25.90

REFERENCIAS

- 1.- Leibovici L, Konisberger H, & Pitlik S D, Bacteriemia and fungemia of unknow origin in adults. *Clin. Inf. Dis.*; **14**: 436-439. 1992.
- 2.- Towns M L, Quartey S M, Weinstein M P, L.G. Reimer M P, Reller L B. The clinical significance of positive blood cultures a prospective, multicenter evaluation. Abstr. C-232. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington D.C. 1993.
- 3.- Arpi M, Bentzon M W, Jensen J, & Fredriksen W. Importance of blood cultured in the detection of bacteriemia. *Eur. J. Clin Microbiol.* **8**: 838-842. 1989.
- 4.- Washington J A, & Iltrup D M. Blood cultures issues and controversies; *Rev. Infect. Dis.* **8**: 792-802. 1986.
- 5.- Weistein M P, Reller L B, Murphy J R, & Lichtenstein K A. The clinical significance of positive blood cultures a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteriemia and fungemia in adults. I Laboratory and epidemiologic observation.; *Rev. Infect. Dis.* **5**:35-53. 1983.
- 6.- Boschman C R, Tucker L J, Dressel D C, Novak C C, Hayden RT, & Peterson L R. Optimizing detection of microbial sepsis. A comparison of culture system using packaged sets with directions for blood collection; *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **23**: 1-9. 1995.
- 7.- Li J, Plorde, & Carlson L G. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol.* **32**: 2829-2831. 1994.

8.-Mirrett S, Weinstein M P, Reimer L G, Wilson M L, & Reller L B. Interpretation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures: does the number of positive bottles help? Abstracts of the 93 rd. General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washinton D. C. 1994.

9.- Aronson M, & Bor D. Blood cultures *Ann. Intern. Med.* **106:** 246-253. 1987.

10- Alfa M, Sanche S. Roman S Y, Fiola P. Lenton, & Hading G. Continuos quality improvement for introduction of automated blood culture instrument.; *J Clin Microbiol.* **33:** 1185-1191. 1995

11.- Mermel L A, & Maki D G. Detection of bacteriemia in adults consequences of culturing an inadecuate volume of blood; *Ann. Intern Med.* **119:** 270-272. 1993.

12.-Krumholz H M, Cumming S, & York M. Blood culture phlebotomy: Switching needles does not prevent contamination; *Ann. Intern. Med.* **113:** 290-292. 1990.

13.- Leisure M K, Moore D M, Schwartzman J D, Hayden G F, & Donowitz L G. Changning the needle when inoculating blood cultures. A no-benefit and high-risk procedure; *JAMA.* **264:** 2111-2112. 1990.

14.- Hall M, Ilstrup M, & Washington J A. Effect of volume of blood cultured on detection of bacteriemia; *J Clin Microbiol.* **3:** 643-645. 1976.

15.- Plorde J, Tenover J, & Carlson L G. Specimen volume versus yield in the BACTEC blood culture system; *J Clin Microbil.* **22:** 292-295. 1985.

- 16.- Reller L B, Murray P R, & Mac. Lowry JD; Cumitech IA. Blood cultures II. Coordinating ed. J. A. Washington American Society for Microbiology. Washington. D. C. 1982.
- 17.- Tenney J H, Reller L B, Mirrett S, Wang W L L, & Weinstein M P. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteriemia and fungemia; J Clin Microbiol. 15: 558-561. 1982.
- 18.- Auckenthaler R, Istrup D M, & Washington J A. Comparison of recovery of organisms from blood cultures diluted 10% (volume volume) and 20% (volume volume); J Clin Microbiol. 15: 860-864. 1982.
- 19.- Eng J. Effect of sodium polyanethiol sulfonate in blood cultures; J Clin Microbiol. 1: 119-123. 1975.
- 20.- Reimer L G, & Reller L B. Effect of sodium polyanetholsulfonate on the recovery of *Gardereella vaginalis* from blood culture media: J Clin Microbiol. 21: 686-688. 1985.
- 21.- Stanek M P, & Vincent S. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by sodium polyanetholsulfonate. J Clin Microbiol. 13: 463-467. 1981.
- 22.-Weintein M P, Mirrett L S, Reimer G, Wilson M L. Controlled evaluation of BacT Alert standard aerobic FAN anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteriemia and fungemia; J Clin Microbiol. 33: 978-981. 1995.
- 23.- Blazevic D J, Stemper J E, & Matsen J. Effect of aerobic and anaerobic atmospheres on isolation of organisms from blood cultures; J Clin Microbiol. 1: 154-156. 1975.
- 24.- Knepper J G, & Anthony B D. Diminished growth of *Pseudomonas aeruginosa* in unvented blood culture bottles. Lancet; 285-287. 1973.

- 25.- Weinstein M P, Mirrett L S, Reimer G, & Reller L B.** Effect of agitation and terminal subcultures on yield & speed of detection of the oxoid- 5 signal blood culture system *versus* the BACTEC radiometric system; J Clin Microbiol. **27**: 427-430. 1989.
- 26.- Wilson M L, Weinstein M P, & Reller L B.** Automated blood culture system; Clin. Lab. Med. **14**: 149-159. 1994.
- 27.-Gill V J.** 1981. Lack of clinical relevance in routine terminal subculturing of blood cultures ; J Clin Microbiol. **14**: 116-118. 1981.
- 28.- Weinstein M P, Reller L B, & Mirret S.** Clinical comparison of an agar slide blood culture bottle with tryptic soy broth and the conventional blood culture bottle with supplemented peptone broth; J Clin Microbiol. **21**: 815-818. 1985.
- 29.- Rodríguez J A G, Sánchez EG, & Bellido J L M.** Comparison of a biphasic system and non-radiometric system for blood culture; J Clin Microbiol. **7**: 666-668. 1988.
- 30.- Wilson M L, Weintein M P, & Reimer L G.** Controlled comparison of the BacT Alert & BACTEC 660 730 non-radiometric blood culture system; J Clin Microbiol. **30**: 323-329. 1992.
- 31.- March&in H, Compan B M, & Perez C.** Detection kinetics for positive blood culture bottles by using VITAL automaed system. J Clin Microbiol. **33**: 209-211. 1995.
- 32.-Wilson M R, & Washington JA.** Anaerobic bacteriemia; Mayo Clin Proc **47**: 639-646. 1972.
- 33.- Ryan M R, & Murray P R.** Laboratory detection of anaerobic bacteriemia; Clin Lab Med. **14**: 107-117. 1994.

- 34.- Pfaller M, & Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infection in the 1990s; Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11: 287-117. 1992.
- 35.- Eng R H, Bishberg E, & Smith S M. Diagnosis of *Mycobacterium* bacteriemia in patients with acquired immunodeficiency Syndrome by direct examination of blood film; J Clin microbiol. 27: 768- 769. 1989.
- 36.- Pierce P R, De Young D R, & the Roberts G D. Mycobacteriemia and the new blood culture systems; 99: 786-789, 1983.
- 37.- Kienhn T E, & Cammarata. Comparative recoveries of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* from isolator lysis-centrifugation and BACTEC 13 A blood culture system. J Clin Microbiol. 26: 760-761. 1988.
- 38.- Thapar M K, & Young E J. Urban outbreak of goat cheese brucellosis. Pediatric Infect Dis. 5: 640-643. 1986.
- 39.- Wilson M L, & Mirrett S. Recovery of select rate and fastidious microorganisms from blood cultures. Clin Lab Med. 14: 119-131. 1994.
- 40.- Chorny J A, & Wilson M L. Rapid detection and identification of microorganims from blood cultures. Clin Lab Med. 14: 181-195. 1994.
- 41.- Reimer L G, Wilson M L, & Weintein M P. Update on the detection of bacteriemia and fungemia. Cinc Microbiol Rev. 444-465. 1997.
- 42.- Pérez M A. Hemocultivos: Experiencia del Hospital Infantil de México (1990-1991). Enfermedades Infecciosa y Microbiología. 12: 188-191. 1992.

- 43.- **Mac Faddin J F.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. 39-159. México D.F. 1984.
- 44.- **Koneman E W.** Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 191-449. México D.F. 1998.
- 45.- **Nussbaum J M , Lewis W.** Rapid diagnosis by buffy coat smear of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. **28**: 631-632. 1990.
- 46.- **Yampara I H.** Importancia creciente del grupo de *Enterococcus* en la patología clínica. Tesis. 18-23. México D.F. 1998.
- 47.- **SIGMA:** Catalogo de reactivos y productos químicos para investigación en ciencias de la vida. 215,355. (1998).
- 48.- **Montesano D J .** Manual del protocolo de investigación Ed. AURUCH 3-153. México D.F. 1999.
- 49.- **Méndez R I.** El protocolo de investigación Ed. Trillas. 11-187. México D.F. 1996.
- 50.- **Wayne W. D.** Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial LIMUSA 119-153. México D.F. 1982.
- 51.- **Lewis A E.** Bioestadística. Editorial Continental 163-185. México D.F. 1982.