

302827

15

29



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

COMPARACION DE DOS METODOS DE
HEMOCULTIVOS PARA AISLAMIENTO DE
MICROORGANISMOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

PATRICIA MONTOYA PEREZ

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995



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 está 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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN:

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

BAJO LA DIRECCION DE:

DRA: JEANNETTE GUARNER LANS

DRA: PATRICIA VOLKOW FERNANDEZ

Y LA ASESORIA DE:

Q.F.B.: ROSARIO VAZQUEZ LARIOS.

AGRADEZCO A DIOS HABERME BRINDADO
LO NECESARIO PARA DESARROLLAR MI
CARRERA PROFESIONAL.

AGRADEZCO A MIS PADRES EL HABERME
DADO LA VIDA.

AGRADEZCO A LA DRA. JANETT WARNER POR SU
VALIOSA AYUDA Y COLABORACION EN EL DESA-
RROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

AGRADEZCO A LA DRA. PATRICIA VOLKOF
POR SU AYUDA Y GRAN APOYO MORAL COMO
SER HUMANO, QUE ME HA BRINDADO HOY Y
SIEMPRE.

AGRADEZCO AL DR. GERARDO SANCHEZ-MEJORADA
POR SU INAPRECIABLE COLABORACION EN LA
REALIZACION DE ESTA TESIS.

AGRADEZCO A LA Q.F.B. ROSARIO VAZQUEZ POR
LA APORTACION DE SU EXPERIENCIA EN ESTE
TRABAJO.

AGRADEZCO A MI HERMANO ANTONIO POR
APOYARME EN LOS MOMENTOS EN QUE MAS
LO NECESITE.

AGRADEZCO A MI HERMANO JESUS POR
SU APOYO INCONDICIONAL.

INDICE

CAPITULO I	INTRODUCCION	PAGINA
1*1	Planteamiento del problema	1
1*2	Objetivos	2
1*3	Hipótesis	
CAPITULO II	ANTECEDENTES	
2*1	Generalidades	3
2*1*1	Bacterias, características y microorganismos en enfermedades neoplásicas	
2*2	Método convencional para hemocultivos frascos de CST	4
2*2*1	Generalidades	
2*2*2	Muestra y volumen de sangre	5
2*2*3	Medios de cultivo	6
2*2*4	Anticoagulante	
2*3	Método no convencional para hemocultivo Lisis-centrifugación (isolator)	7
2*3*1	Generalidades	
2*3*2	Lisis-centrifugación, ventajas y desventajas	8
2*3*3	Comparación del método de L-C (isolator) con otros métodos para hemocultivos	
CAPITULO III	MATERIAL Y METODO	
3*1	Diagrama	9
3*2	Material	10
3*2*1	Material biológico	
3*2*2	Material de laboratorio	
3*2*3	Reactivos	
3*2*4	Medios de cultivo	11
3*2*5	Varios	
3*3	Metodología	12
3*3*1	Toma de la muestra	
3*3*2	Método convencional para hemocultivos frascos de CST	
3*3*3	Método de L-C (isolator)	
3*4	Datos epidemiológicos	13
3*5	Estadística	
CAPITULO IV	RESULTADOS Y DISCUSION	
4*1	Resultados	
4*2	Discusión	
	CONCLUSIONES	21
CAPITULO V	BIBLIOGRAFIA	22

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema

La bacteremia es una causa importante de la morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer. Esto es debido a que el tratamiento antineoplásico afecta en el ciclo celular de aquellas células con alto recambio, lo que incluye a las células tumorales pero también al tejido hematopoyético. Las células que combaten infecciones sufren linfopenia y por ello los pacientes con cáncer en quimioterapia son más propensos a las bacteremias y septicemias (25).

El principal impacto en el sistema inmune es la disminución de las células fagocíticas principalmente. En el Instituto Nacional de cancerología (INCan) la tasa de mortalidad en pacientes con cáncer y bacteremia fué de 35.5 %. En el periodo comprendido de 1986 a 1989.

El hemocultivo es un estudio microbiológico indispensable para documentar una bacteremia ya que es la forma de conocer al microorganismo que ocasiona el problema en el paciente. Además ayuda a elegir la terapia antimicrobiana más adecuada. Por lo tanto, se debe de contar con un método eficaz para hemocultivos, de acuerdo a las características de cada hospital.

En el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la ciudad de México hasta el año de 1988 se utilizaron para hemocultivos los frascos de caldo de soya tripticaseína (CST) se hacían siembras ciegas a las 24, 48 horas y 7 días (de acuerdo a la técnica utilizada con la finalidad de tener la mayor probabilidad de obtener cualquier microorganismo presente en la muestra en cualquiera de estas siembras). Debido a las grandes ventajas reportadas en la literatura (2) del método Lisis-centrifugación (isolator) que incluían menos tiempo para obtener resultados positivos, no necesitar subcultivos múltiples, la mayor probabilidad de tener cultivos positivos en pacientes que han recibido antibióticos y en aquellos que se sospecha infección por microorganismos intracelulares como hongos y micobacterias; se creyó conveniente cambiar a este nuevo método. Así a partir de 1989 se utilizó solamente el método de L-C (isolator).

Al finalizar el año de 1989 se encontró que con el L-C (isolator) la positividad en los cultivos disminuyó a 11.9 % contra lo obtenido en años anteriores con el método de frascos CST (17.4 %). Estos resultados condujeron a realizar el presente estudio cuyo objetivo fundamental es el comparar ambos métodos (CST y L-C) simultáneamente.

1*2 **Objetivos**

1*2*1 **Objetivos generales**

- Comparar dos métodos de hemocultivos (frascos de CST y Lisis-centrifugación isolator) con la finalidad de analizar cual de los dos ofrece las mejores características para su uso en el (INCan).

- Determinar si los hemocultivos positivos representan una bacteremia real o no y conocer el aspecto clínico del paciente con bacteriemia, el manejo antimicrobiano y la respuesta a este.

- Conocer la proporción de los diferentes microorganismos aislados durante este período de estudio y establecer las diferencias entre los dos métodos de acuerdo a los microorganismos aislados.

- Comparar los resultados obtenidos con los informados en la literatura .

1*2*2 **Objetivos particulares**

- De acuerdo a los resultados que se obtengan, tomar una decisión ya sea de anular o limitar el uso de alguno de los métodos.

1*3 **HIPOTESIS**

1*3*1 **Hipótesis nula**

- No existen diferencias importantes para el aislamiento bacteriano entre el método para hemocultivos de frascos de caldo de soya tripticaseína y el método de Lisis-centrifugación (isolator).

1*3*2 **Hipótesis alterna**

- Existen diferencias importantes para el aislamiento bacteriano entre el método para hemocultivos de frascos de caldo de soya tripticaseína y el método de Lisis-centrifugación (isolator).

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2*1 Generalidades

El hemocultivo es el cultivo de sangre del paciente. Generalmente se realiza en un paciente con fiebre con o sin un sitio específico de infección (por ejemplo del tracto urinario o de las vías respiratorias) para poder determinar el microorganismo causante del cuadro infeccioso y guiar la terapia antimicrobiana específica (25).

En el caso de los pacientes con cáncer y debido a la terapia a la que ellos son sometidos los hemocultivos tienen vital importancia. Un porcentaje importante de estos pacientes presentan alteración del sistema inmune principalmente, neutropenia (disminución de la cantidad de neutrófilos) y linfopenia (disminución de la cantidad de linfocitos), lo que los hace muy susceptibles a infecciones. En ellos los síntomas pueden ser muy sutiles como febrícula (ligero aumento en la temperatura por cortos periodos de tiempo), mal estado general, astenia, andinamia (debilidad en el paciente) y pudiendo cursar con una infección con bacteriemia que puede llevarlos a la muerte en pocas horas. El tomar el hemocultivo y proporcionar resultados en corto tiempo pueden ayudar a la institución a dar una terapia adecuada y así salvar la vida del paciente (25).

2*1*1 Bacteremias, características y los microorganismos en enfermedades neoplásicas

La bacteremia es la invasión de la corriente sanguínea por ciertos microorganismos o sus productos tóxicos. Las manifestaciones clínicas son: fiebre, escalofríos, taquicardia y alteración mental (25).

Cuando se presenta descenso en la presión arterial (signos de riego sanguíneo insuficiente a los órganos vitales) se denomina Shock séptico. Aún con un tratamiento antimicrobiano adecuado, los enfermos que desarrollan síndrome de respuesta inflamatoria a un shock mueren. (7).

Actualmente las bacteremias por gérmenes gram negativos representan un problema infeccioso común y serio en los Estados Unidos (25). En el estudio realizado por el Dr. Lazo de la Vega, en el INCan, se encontró que la mortalidad era de 35.5 %. En este estudio se encontró que las dos terceras partes de las bacteremias fueron por bacterias gram negativas.

Dos tercios de los enfermos que presentan bacteremias se encontraban hospitalizados, con procesos subyacentes o que se les hayan procesado técnicas que favorecen a la invasión de la corriente sanguínea (25).

A pesar de la introducción de nuevos agentes antimicrobianos la mortalidad global de las bacteremias por microorganismos gram negativos (bacterias que fijan el colorante de safranina) han aumentado en un 25 % aproximadamente (25). Durante los dos últimas décadas, los factores predisponentes identificados son: diabetes mellitus, cirrosis, alcoholismo, cáncer, quimioterapia citotóxica y fármacos inmunosupresores, nutrición parenteral, diversas técnicas quirúrgicas o infecciones procedentes del tubo digestivo, vías biliares y urinarias.

Los aspectos clínicos de una bacteremias son:

Edad: Con los extremos de la vida principalmente, los neonatos de bajo peso y los ancianos mayores de 60 años, tiene un riesgo mayor de contraer septicemias por microorganismos gram negativos, en comparación con la población general.

Enfermedades subyacentes: Las frecuencias de las septicemias bacterianas se elevan cuando los pacientes sufren tumoraciones sólidas y neoplásicas hematopoyéticas como son mieloma múltiple y leucemias.

Cirugía o instrumentación: La cirugía o instrumentación del aparato urinario, sistema biliar y/o tubo digestivo, pueden ser focos iniciales de infección que luego dan origen a una septicemia bacteriana.

Terapia previa: El uso de los antibióticos de amplio espectro predisponen al paciente a bacteremias por gram negativos porque alteran la flora bacteriana normal como los medicamentos-inmunosupresores evitan que el huésped resista de modo eficaz una infección, lo que tiene como consecuencia una bacteriemia (7).

Las bacteremias pueden ser: transitorias, intermitentes y continuas. La bacteremias transitoria se debe a una manipulación de tejidos infectados o colonizados como son las mucosas superficiales. La bacteremias intermitente es causada por abscesos no drenados (abscesos que continen aún secreciones acumuladas) y por lo general ocurren cuando existe una infección localizada. La bacteremia continua es característica de infecciones intravasculares particularmente endocarditis bacteriana (7).

2•2 Método convencional para hemocultivos, frascos de CST

2•2•1 Generalidades

Es importante efectuar la toma de la muestra para hemocultivos de forma correcta para evitar contaminaciones y extraer la cantidad correcta de sangre.

El caldo de soya tripticaseína (CST) es un medio altamente nutritivo, que contiene:

Peptona de caseína	17.0 g/l
Peptona de soya	3.0 g/l
Cloruro de sodio	5.0 g/l
Fosfato dipotásico	2.5 g/l
Dextrosa	2.5 g/l
Ph final de 7.3 +/- 0.2	

Debido a que en su fórmula existen dos peptonas, facilita el crecimiento de microorganismos exigentes y difíciles sin la necesidad de añadir sueros u otros materiales.

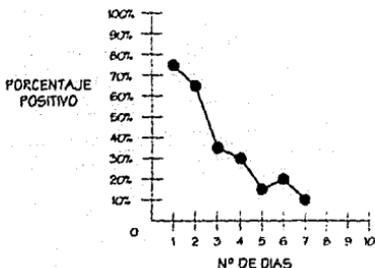
2*2*2 Muestra y volumen de sangre

Generalmente dos hemocultivos tomados a diferente hora son suficientes para aislar a un microorganismo. En la clínica Mayo se ha demostrado que el rango de positividad de los hemocultivos en un periodo séptico será de para un hemocultivo, para dos hemocultivos y para tres hemocultivos (25).

En la gráfica N° 1 se puede observar que es muy importante hacer la toma de sangre en el tiempo adecuado para poder aislar al microorganismo.

Cuando se aumenta el número de hemocultivos tomados por paciente se incrementa el porcentaje de positividad para aislar al microorganismo, ya que a mayor número de hemocultivos tomados, menor será el porcentaje de falsos negativos que se tendrán.

La finalidad de recolectar un volumen determinado para cada muestra de sangre es incrementar la posibilidad de cultivar el menor número de microorganismos presentes en la muestra.



GRAFICA N°1 Evolución de la fiebre tifoidea: D. Morgan, H. the salmonella en Dubas R. (ed), Bacterial and Mycotic infection of man J.B. Lippincott Co. (1858).

Las bacterias son inhibidas por el suero humano aún después de ser diluida 20 veces la sangre con el medio de cultivo. El tabla N° 2 se ejemplifica que entre mayor sea la dilución tenemos un mayor número de cultivos positivos.

TABLA N° 2

DESARROLLO DE INOCULOS PEQUEÑOS EN MEZCLA DE SANGRE Y CALDO			
Desarrollo de <i>Streptococcus viridans</i> de inóculos pequeños en mezcla de sangre y caldo		Desarrollo de <i>E. coli</i> de inóculos pequeños en mezcla de sangre y caldo	
sangre / caldo	fcos + / total inoculados	sangre / caldo	fcos + / total inoculados
1/60	17/18	1/60	16/16
1/50	18/18	1/50	14/16
1/40	18/18	1/40	14/16
1/30	18/18	1/30	15/16
1/20	14/18	1/20	12/16
1/10	9/18	1/10	9/16
1/5	9/18	1/5	8/16
1/2	4/18	1/2	3/16
1/1	7/18	1/1	1/16

La dilución de la muestra de sangre en el medio de cultivo reduce los mecanismos de inmunidad celular y humoral del huésped que pudieran seguir activos en la sangre en el momento de extraerla para el cultivo (25).

2*2*3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizan para sembrar los hemocultivos son los siguientes: para el aislamiento de bacterias gram positivas, gram negativas y específicamente para poder observar las hemólisis se emplea el medio de gelosa sangre, para el aislamiento de bacilos gram negativos específicamente, así como la utilización de la lactosa, se emplea el agar MacConkey, cuando nos interesa aislar bacterias que crecen mejor en una atmósfera parcial de CO₂ se emplea gelosa chocolate, en el caso de que se sospeche la presencia de levaduras y hongos la muestra se siembra en agar de Saboraud. Estos medios son los que se emplean de rutina en una muestra para hemocultivo.

MEDIO DE CULTIVO	ESPECIFICIDAD BACTERIANA	OTRAS CARACTERÍSTICAS
Agar gelosa sangre	gram - y gram +	Observación de las hemólisis, alfa, beta y gama.
Agar Mac Conkey	gram -	Utilización de la lactosa
Agar Gelosa chocolate	gram + y gram -	Crecimiento de microorganismos que necesitan atmósfera de CO ₂
Agar Saboraud	levaduras y hongos	Crecimiento de levaduras y hongos que necesitan más de 72 horas

2*2*4 Anticoagulante

Los frascos de CST para los hemocultivos contienen además de los nutrientes para las bacterias, polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante, este actúa también inhibiendo la fagocitosis, el complemento, la actividad de la lisozima (enzima que degrada la pared celular de la bacteria) y disminuye la eliminación de las bacterias por los neutrófilos (25).

2*3 Método no convencional para hemocultivo

2*3*1 Generalidades

Los tubos del método de L-C (isolator), son al vacío y contienen:

AGENTE	FUNCION	PROPOSITO
Jabón	lisar a las células del huésped.	lisar a las células rojas y blancas de la sangre presentando una concentración eficiente de los microorganismos por centrifugación.
Polipropilenglicol	Disminuir la espuma	disminuye la tendencia natural de formar espuma en detergente.
Polianetolsulfonato de sodio	anticoagulante	combate el efecto bactericida de la sangre inhibiendo la fagocitosis, complemento y la actividad de la lisozima. Disminuye la actividad antibacteriana de los aminoglucósidos y poliminas.
EDTA	anticoagulante	quelante de calcio, previene la formación de coágulo, de fibrina e inhibe la cascada del complemento.

2*3*2 Lisis-centrifugación, ventajas y desventajas

Este tubo no funciona como medio de cultivo, razón por la cual el tiempo transcurrido para ser procesada la muestra es fundamental ya que el medio carece de nutrientes y las bacterias presentes no pueden sobrevivir un largo periodo de tiempo. Las ventajas que presente este método es que se procesa el mismo día en que toma la muestra de sangre y no se hacen subcultivos. El rango de contaminación para el método de frascos de CST es de 2% y para el método de L-C es de 1.5 a 2.6%.

2*3*3 Comparación del método L-C (isolator) con otros métodos para hemocultivos.

La literatura reporta trabajos donde comparan al sistema L-C (isolator) con otros métodos como son:

- Patrick R. Murray y colaboradores compararon el sistema bifásico Roche-senti-check con el método L-C (isolator) para obtención de hongos en sangre. Ellos reportan 199 hemocultivos positivos. Por el método de L-C (isolator) se aislaron 178 (89.4%) y con el Septi-check 119 (59.7%), por lo que concluyen que el método de L-C (isolator) es un método más sensible para aislar hongos en sangre (16).

- Yaques Billi y colaboradores evaluaron el L-C (isolator) y el método bifásico infusión cerebro corazón, especialmente para aislar hongos en muestras de sangre, 86.6% se detectaron por el sistema L-C (isolator) y 70% por el bifásico infusión cerebro corazón. Ellos concluyen que el L-C (isolator) aumenta la sensibilidad para detectar hongos (2).

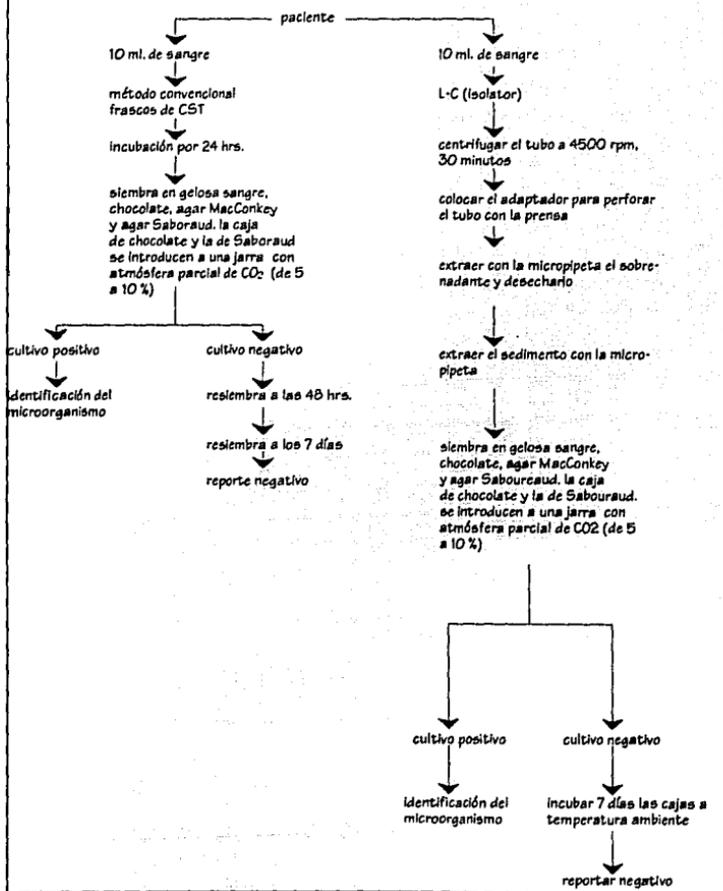
- Patrick R. Murray y W. Spizzo hicieron un estudio comparativo entre L-C (isolator) y los sistemas Septi-check-BHI con saponín y Septi-check caldo de soya tripticaseína. En este trabajo se logró un mejor aislamiento con el sistema Septi-check-BHI con saponín que con el L-C (isolator), el tiempo empleado para el aislamiento fue el mismo para ambos métodos. También se menciona que el L-C (isolator) es una técnica de múltiples manipulaciones que incrementa el riesgo de contaminación del cultivo (17).

- Evaluaciones preliminares realizadas por Jung Kend, Rocher y colaboradores, demostraron que el sistema Septi-check-BHI con saponín fue mejor que el sistema Septi-check-caldo de soya tripticaseína $p < (0.05)$ y respecto al sistema L-C (isolator) $p < (0.001)$ (16).

Jeffrey l Carla Guillo y colaboradores compararon el L-C (isolator) con el sistema Bactec 26 plus. De 11,506 episodios, se aislaron 626 bacterias y hongos con el sistema Bactec 26 plus, 499 fueron aislados por el método L-C (isolator). El L-C (isolator) fue positivo para 59 hemocultivos comparado con el Bactec 26 plus, que fue positivo para 45 hemocultivos, de este trabajo se concluye que el sistema Bactec 26 plus y el L-C (isolator) son métodos que tienen ventajas muy similares, méritos individuales y deficiencias propias de cada uno (10).

CAPITULO III

3=1 Diagrama de flujo



3*2 Material

3*2*1 Material biológico

Durante el estudio se tomaron hemocultivos a 304 pacientes dando un total de 99 hemocultivos pareados (hemocultivos de un mismo paciente tomados al mismo tiempo bajo las mismas circunstancias). Se verificó que presentaron una bacteriemia real en el periodo en el que se les tomó la muestra de sangre, esta fué sembrada en los dos métodos al mismo tiempo y con la misma muestra de sangre, esto es, tomando 20 ml. de sangre de cada paciente por toma, 10 ml. para los frascos de CST y 10 ml. para L-C (isolator).

3*2*2 Material de laboratorio

pipetas graduadas (1,5,10 ml.)
matraces Erlenmeyer (500 y 100 ml.)
tubos de ensayo (13x75 y 13x100)
cajas petri
asa calibrada (0.001)
hisopos
pinzas de disección
pipetas Pasteur
micropipetas para tubos isolator
macropipetas para tubos isolator
adaptador para perforar los tubos isolator
agujas hipodérmicas estériles (21x32)
frascos para hemocultivos de 120 ml. (DIFCO)
tubos para hemocultivos isolator 10 ml. (Dupont)

3*2*3 Reactivos

Cloruro de calcio	(Baker analysed)
Cloruro de Magnesio	(Baker analysed)
Cloruro férrico	(Baker analysed)
Hidróxido de potasio	(Baker analysed)
Acido sulfúrico	(Baker analysed)
Acido clorhídrico	(Baker analysed)
Etanol	(Baker analysed)
Acetona	(Baker analysed)
Yodo	(Baker analysed)
Yoduro de potasio	(Baker analysed)
Reactivo de Kovac's	(MERCK)
Alfa-naftol	(SIGMA)
Cristal violeta	(SIGMA)
Polianetol sulfonato de sodio	(SIGMA)
Safranina	(HARLECO)
Poliiodine	(EMQ)

3*2*4 Medios de cultivo

base de agar sangre	(BIOXON)
agar de MacConkey	(BIOXON)
agar Mueller-Hinton	(BIOXON)
agar de Sabouraud.	(BIOXON)
agar de citrato de Simons	(BIOXON)
agar de hierro Kligler	(BIOXON)
agar hierro y lisina	(BIOXON)
caldo de soya tripticaseína	(BIOXON)
caldo de infusión cerebro corazón	(BIOXON)
medio sim	(BIOXON)
medio mio	(BIOXON)
caldo rojo fenol sacarosa	(BIOXON)
medio de Voges-Proskaver	(BIOXON)
tubos de Lowenstein-Jensen	(BIOXON)
agar esculina-bilis	(MERCK)

3*2*5 Varios

API 20 E	(MERCK)
API NFT	(MERCK)
tipibac PN	(BIGAUX)
tipibac A	(BIGAUX)
microscopio	(Leintz)
prensa para tubos de isolator	(Termolyne)
tubos de isolator	(Becton-Dickinson)
centrifuga	(Incesa)

3*3 METODOLOGÍA

El estudio se realiza de junio de 1992 a abril de 1994 tiempo en el que ambos métodos se emplean de forma paralela, inoculando ambos sistemas al mismo tiempo y con la misma muestra.

3*3*1 Toma de la muestra

Después de limpiar el sitio de punción venosa con una torunda con yodo comenzando del sitio exacto y desplazándose en sentido periférico con un movimiento circular; se hace la punción, se extraen 20 ml. de sangre, se limpia con yodo la tapa del frasco con CST y se inyectan los 10 ml. de sangre, los otros 10 ml se inoculan en un tubo de isolator después de limpiar la tapa con yodo y se trasladan al laboratorio. La muestra de sangre periférica se debe de tomar cuando el paciente esté en el periodo de escalofríos, sin terapia antimicrobiana. Para tener mejores resultados es necesario tener por lo menos, 2 hemocultivos de diferente brazo y con diferencia de tiempo de 30 minutos.

3*3*2 Método convencional para hemocultivos frascos de CST

Después de obtener 10 ml. de sangre del paciente en condiciones de asepsia:

- 1.- Limpiar el tapón del frasco con isodine e inyectar en él la muestra de sangre
- 2.- Incubar 24 hrs el frasco a 35° centígrados
- 3.- Sembrar una caja de agar sangre, MacConkey, chocolate y sabouraud, Incubar estas 24 hrs. a 35° centígrados.
- 4.- En caso de que la primera resiembra no sea positiva, resembrar a las 48 hrs. y a los 7 días.
- 5.- Observar si no existe crecimiento y reportar como negativo.

3*3*3 Método de Lisis-centrifugación (Isolator)

Después de tomar la muestra de sangre en condiciones de asepsia, el tapón del tubo se limpia con isodine y se le inyectan 10 ml. de sangre del paciente. Se traslada lo más rápido posible al laboratorio y ahí se procesa inmediatamente de la siguiente manera:

- 1.- Centrifugar los tubos a 4500 rpm durante 30 minutos
- 2.- Limpiar el tapón del tubo con isodine y colocar el adaptador para perforarlo con la prensa.
- 3.- Absorber el sobrenadante con una micropipeta
- 4.- Dar vortex (mezclar) durante 10 segundos
- 5.- Absorber el precipitado con una micropipeta
- 6.- Sembrar en los medios de cultivo correspondiente
- 7.- Incubar las cajas 24 horas a 35° centígrados y observar
- 8.- Si las cajas no presentan crecimiento, dejar en observación durante 7 días a temperatura ambiente.

3•4 DATOS EPIDEMIOLOGICOS

Al terminar la parte experimental, revisar retrospectivamente los expedientes clínicos poniendo especial atención a los siguientes aspectos, tipo de neoplasia, estado clínico, tratamiento antineoplásico y/o antimicrobiano, fiebre neutropénica, en el momento de la toma del hemocultivo, número de hemocultivos tomados, presencia tanto clínica como bacteriológica de infección en otro órgano en el momento de la toma de la muestra. Se consideró como bacteremia real al cumplirse con los siguientes criterios:

- 1.- Presencia de datos clínicos compatibles con bacteremia (fiebre, leucocitosis, neutropenia, etc.).
- 2.- Que el microorganismo aislado en sangre sea el mismo al aislado en otro sitio del cuerpo.
- 3.- Que el crecimiento bacteriano se presente en por lo menos dos de las muestras para hemocultivo.
- 4.- Que el paciente tenga mejoría clínica con el tratamiento antimicrobiano específico.

Todos los casos que no cumplieran con por lo menos 3 de estos criterios fueron considerados como pseudobacteremias.

3•5 ESTADISTICA

Se compararon ambos métodos de acuerdo al número de hemocultivos positivos para cada uno de los métodos. Se analizaron las frecuencias para ambos métodos en cuanto a los microorganismos, tipos de neoplasia, neutropenia y otros parámetros.

La comparación de ambos métodos en cuanto al porcentaje de aislamiento se realizó por la prueba de χ^2 ; se obtuvo una $P < (0.0001)$, con lo que estadísticamente se comprueba que efectivamente el aislamiento es diferente para ambos métodos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Durante este periodo de estudio se tomaron hemocultivos pareados a 304 pacientes distribuidos de la siguiente manera:

CUADRO N° 3

NUMERO DE CASOS DE HEMOCULTIVOS TOMADOS A 304 PACIENTES	
162	CASOS (53%) SE LES TOMO UN JUEGO DE HEMOCULTIVOS
125	CASOS (41%) SE LES TOMARON DOS JUEGOS DE HEMOCULTIVOS
17	CASOS (6%) SE LES TOMARON 3 JUEGOS DE HEMOCULTIVOS
TOTAL 304	CASOS

De los 304 pacientes 61 (20%) de ellos presentaron hemocultivos positivos, 57 (93%) cumplieron con la definición de bacteriemia real; a los 4 pacientes restantes se les definió como pseudobacteremias.

CUADRO N° 4

NUMERO DE PACIENTES CON HEMOCULTIVOS POSITIVOS		
PACIENTES CON HEMOCULTIVOS POSITIVOS	BACTEREMIA REAL	PSEUDOBACTEREMIA
61	57 (93.4%)	4 (6.6%)

La posibilidad de obtener hemocultivos positivos aumentó de acuerdo al número de hemocultivos tomados por pacientes. Al relacionar el número de casos de hemocultivos pareados con el número de juegos de hemocultivos tomados a los 61 pacientes se observa lo siguiente:

CUADRO Nº 5

RELACION ENTRE NUMERO DE PACIENTES CON HEMOCULTIVOS POSITIVOS Y CASOS DE HEMOCULTIVOS TOMADOS		
PACIENTES CON HEMOCULTIVOS POSITIVOS	% DE ACUERDO AL NUMERO DE HEMOCULTIVOS PAREADOS	Nº DE HEMOCULTIVOS TOMADOS
29	(17.9 %)	1
26	(20.8 %)	2
6	(35.2%)	3
TOTAL 61 PACIENTES		

De acuerdo al número de hemocultivos y método empleado con respecto a las bacteremias (infección real) y pseudobacteremias (contaminación del cultivo sin infección del paciente) se observa que las 4 pseudobacteremias existentes, 2 pertenecen al método convencional CST y 2 al de L-C (isolator), por lo tanto el porcentaje de contaminación fué el mismo para ambos métodos. Las bacterias aisladas en las pseudobacteremias fueron en todos los casos *Estafilococos coagulasa negativa*. Las pseudobacteremias se presentaron en la primera toma del paciente y en uno de los casos en la única toma.

A los 61 pacientes se les tomó un total de 99 hemocultivos pareados para ambos métodos, el porcentaje de bacterias aisladas para cada uno de ellos fué el siguiente:

CUADRO Nº 6

COMPARACION DE DOS METODOS DE HEMOCULTIVOS DE ACUERDO AL PORCENTAJE DE AISLAMIENTO					
BACTEREMIA REAL	CST +	CST -	P < (0.0001)	L-C +	L-C -
	78 (78.7%)	14 (14.1%)		46 (46.4%)	46 (46.4%)
PSEUDOBACTEREMIA	2 (2%)	5 (5%)	2 (2%)	5 (5%)	

En el cuadro N° 7 se presenta desglosado con número de muestras para ambos métodos en cuanto a la bacteremia y pseudobacteremia. Estadísticamente se observa que ambos métodos son diferentes en cuanto al aislamiento bacteriano teniendo una $p < (0.0001)$.

CUADRO N° 7

BACTEREMIAS Y PSEUDOBACTEREMIAS DE ACUERDO AL METODO DE HEMOCULTIVO EMPLEADO Y AL NÚMERO DE MUESTRAS TOMADAS							
		muestra 1		muestra 2		muestra 3	
		CST +	LC +	CST +	LC +	CST +	LC +
Pacientes con una sola muestra	bacteremia real	26	14				
	pseudobacteremia	1	0				
Pacientes con dos muestras	bacteremia real	22	14	20	12		
	pseudobacteremia	1	2	0	0		
Pacientes con tres muestras	bacteremia real	3	1	3	1	3	3
	pseudobacteremia	0	0	0	0	0	0
Total	bacteremia real	53	29	23	13	3	3
	pseudobacteremia	2	2	0	0	0	0

De acuerdo al tipo de método empleado se observó que con el método convencional de frascos de CST se aisló un mayor número de bacterias que con el L-C (isolator), la E coli es la que con mayor frecuencia se aisló en los dos métodos. Así mismo el aislamiento para las levaduras fue mejor con el método convencional. En resumen se observa que el método de CST logra aislar un mayor número de microorganismos, incluyendo a los hongos.

En el cuadro N° 7 se muestra la frecuencia relativa de los microorganismos aislados de hemocultivos para el método de CST y el de Lisis-centrifugación.

CUADRO N° 8

FRECUENCIA RELATIVA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DE HEMOCULTIVO POR EL METODO CONVENCIONAL CST Y EL DE L-C (ISOLATOR)				
MICROORGANISMOS	CST		LC	
Escherichia coli	24	(43%)	15	(26%)
Staphylococcus aureus	7	(12%)	5	(9%)
Klebsiella pneumoniae	6	(11%)	4	(7%)
Enterobacter sp	6	(11%)	4	(7%)
Candida sp	4	(7%)	1	(2%)
Pseudomonas sp	3	(5%)	3	(5%)
Staphylococcus coagulans negativa	3	(5%)
Morganella morganii	1	(2%)	1	(2%)
Enterococcus sp	1	(2%)
Streptococcus sp	1	(2%)

En cuanto a la frecuencia de microorganismos se observó que el mayor porcentaje se obtiene con el método de CST, de bacterias como E.coli que son poco exigentes hasta las levaduras que deberían de tener un mejor aislamiento con el método L-C de acuerdo a la literatura (2,17).

Se observa que los pacientes con leucemia linfoblástica aguda presentan un mayor número de bacteremias, ya que son sometidos a tratamientos con quimioterapia que traen como consecuencia periodos de neutropenia grave. Se analizaron 14 casos con leucemia linfoblástica aguda, 6 con linfoma, 6 con VIH+ y sarcoma de Kaposi, 6 con cáncer gástrico y otras neoplasias que por ser un número pequeño de casos no se incluyeron en este análisis. Los microorganismos que con mayor frecuencia se aislaron en estas neoplasias se muestran en el cuadro N°9.

CUADRO N°9

TIPO DE NEOPLASIA Y MICROORGANISMOS MAS FRECUENTES ASOCIADOS A BACTEREMIAS		
TIPO DE NEOPLASIA	MICROORGANISMO	PORCENTAJE
Leucemia linfoblástica aguda	Escherichia coli	4 (28.5%)
	Escherichia aerogenes	3 (21.4%)
	Streptococcus pneumoniae	3 (21.4%)
	Enterobacter sp	3 (21.4%)
	Escherichia coli plasmata negativa	1 (7.1%)
Linfomas	Escherichia coli	2 (25%)
	Escherichia aerogenes	1 (12.5%)
	Candida albicans	1 (12.5%)
	Streptococcus sp	1 (12.5%)
	Salmonella sp	1 (12.5%)
	Penicillium sp	1 (12.5%)
	Enterococcus sp	1 (12.5%)
	Aspergillus sp	1 (12.5%)
V H I + sarcoma de Kaposi	Salmonella sp	3 (50.0%)
	Escherichia coli	2 (33.3%)
	Enterococcus sp	1 (16.6%)
Cáncer gástrico	Escherichia coli plasmata negativa	3 (50.0%)
	Escherichia aerogenes	1 (16.6%)
	Escherichia coli	1 (16.6%)
	Candida albicans	1 (16.6%)

Se analizaron los 57 pacientes que presentaron hemocultivos positivos y cumplieron con los criterios de bacteriemia real, estos están distribuidos en 14 casos con leucemia linfoblástica aguda, 6 con linfoma (Hodgkin y no Hodgkin) 2 con mieloma múltiple, 6 con VIH + y sarcoma de Kaposi, 6 con cáncer gástrico, 3 con cáncer de vejiga, 3 con cáncer cervico uterino, 3 con cáncer de recto, 2 con cáncer de tiroides y 12 casos con diferentes tipos de cáncer que se clasificaron como otros. En el cuadro N° 10 se observa que la fiebre está muy relacionada a la infección; sin embargo en este tipo de pacientes la fiebre puede ser ocasionada por actividad tumoral y necrosis de los tejidos. Por otra parte la neutropenia se asoció a más del 50 % de los casos con leucemia linfoblástica aguda, pero no a linfomas ni a otros tumores.

CUADRO N°10

RELACION ENTRE FIEBRE Y/O NEUTROPENIA DE ACUERDO AL TIPO DE NEOPLASIA Y CON HEMOCULTIVO POSITIVO			
TIPO DE NEOPLASIA	Nº DE PACIENTES	NEUTROPENICOS	FIEBRE
Leucemia linfoblástica aguda	14	8	12
linfoma	no Hodgkin	3	0
	Hodgkin	3	1
mieloma múltiple	2	1	1
VIH + sarcoma de Kaposi	6	0	6
Cáncer gástrico	6	0	4
Cáncer vejiga	3	0	3
Cáncer cervicouterino	3	0	2
Cáncer recto	3	0	3
Cáncer bariátrico	2	0	2
otros	12	2	9

De acuerdo a los pacientes en los que se logró saber si se encontraban en el momento del estudio neutropénicos o no (en algunos casos la biometría y la diferencial no se encontró reportada en el expediente), la distribución de los microorganismos se describe en el cuadro N° 11.

CUADRO N°11

FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS EN PACIENTES NEUTROPENICOS Y NO NEUTROPENICOS	
PACIENTES NEUTROPENICOS	PORCENTAJE
Echerichia coli	6 (35.2%)
Klebsiella pneumoniae	3 (17.6%)
Enterococcus aureus	2 (11.7%)
Enterobacter sp	2 (11.7%)
Pseudomonas aeruginosa	1 (5.8%)
Pseudomonas sp	1 (5.8%)
Salmonella sp	1 (5.8%)
Streptococcus sp	1 (5.8%)
PACIENTES NO NEUTROPENICOS	PORCENTAJE
Echerichia coli	13 (40.6%)
Enterococcus faecium	4 (12.5%)
Enterobacter sp	3 (9.3%)
Candida albicans	2 (6.2%)
Candida sp	2 (6.2%)
Enterococcus faecalis	2 (6.2%)
Salmonella sp	2 (6.2%)
Pseudomonas aeruginosa	1 (3.1%)
Pseudomonas sp	1 (3.1%)
Morganella morganii	1 (3.1%)
Enterococcus sp	1 (3.1%)

Existen varios puntos fundamentales para que un método de hemocultivo funcione de manera adecuada, uno de ellos es que la toma de la muestra, debe de ser en el periodo de escalofríos, de preferencia sin terapia antimicrobiana y por lo menos se deben tomar dos hemocultivos de diferente brazo con un intervalo de tiempo de 30 minutos. Si la muestra no es tomada de esta manera los resultados serán reflejo directo de alguna de estas fallas, si no se toma de esta manera y la muestra no se traslada al laboratorio inmediatamente o se toma en el transcurso de la noche cuando no hay quien las procese hasta el día siguiente; es por eso que en el INCAN tenemos menor positividad con L-C que con los resultados que se reportan en la literatura (2,17). Es importante hacer notar que cuando la muestra no contiene el volumen adecuado o es hemolizada afecta en los resultados del método de L-C (Isolator).

En cuanto a la contaminación, la información no proporcionó diferencias, en cuanto a los métodos y/o el microorganismo aislado.

La literatura reporta que a mayor número de hemocultivos por paciente que se tomen aumenta la posibilidad de aislar el microorganismo. Esto hace notar que mientras no mejore la cantidad de hemocultivos tomados por paciente, el laboratorio no podrá aislar con facilidad el microorganismo causante de la infección y la terapia antimicrobiana difícilmente será la óptima.

El método convencional de frascos de CST funciona mejor en el INCAN. Se cree que se debe a que las muestras que son tomadas en el transcurso de la noche no se procesan inmediatamente; por otra parte no se sigue estrictamente el procedimiento correcto de las muestras ya que la toma de la sangre se hace con jeringa y en algunas ocasiones el volumen no es correcto, la velocidad de centrifugación fué menor a la que la manufactura recomienda y en algunas ocasiones la sangre que es depositada en el hemocultivo está hemolizada. Esta serie de circunstancias adversas afectan en gran forma al método de L-C (isolator).

En un estudio que realizaron Inagaki J, Rodriguez V, en el hospital Anderson para analizar las causas más frecuentes de muerte en pacientes con cáncer, observaron que la causa más frecuente son las infecciones, estas son causadas en su mayoría por bacilos gram negativos, principalmente E coli, Pseudomonas sp y Klebsiella pneumoniae. En nuestro hospital (INCan) se tiene que la tasa de mortalidad de pacientes con cáncer y bacteremia es de un 35.5 % según el estudio realizado por el Dr. Lazo de la Vega de 1986-1989. En este estudio se observó que la mayoría de pacientes con cáncer y bacteremia se debe a infecciones por bacterias gram negativas ocupando el primer lugar la E coli, seguida de Klebsiella pneumoniae.

La literatura reporta que el paciente neutropénico es más susceptible a infectarse. Las Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Estafilococos epidermidis y hongos se aíslan con frecuencia, según estudios realizados por Lowell S. en los Angeles California. Los resultados reportan que en los pacientes neutropénicos la E coli es la bacteria que con más frecuencia se aísla, pero que no existen diferencias de acuerdo a pacientes no neutropénicos. Probablemente esta diferencia con la literatura de tener un mayor número de pacientes neutropénicos infectados que no neutropénicos se debe a que no a todos los pacientes de este estudio se les pudo determinar si eran pacientes neutropénicos o no por falta de datos en el expediente.

CONCLUSIONES

- 1.- La diferencia entre los dos métodos de acuerdo al número de hemocultivos positivos de las bacteremias reales es estadísticamente significativa $p < (0.0001)$ lo que indica que el método convencional de frascos de CST funciona mejor de acuerdo a las características particulares del INCan.
- 2.- Se deben de tomar por lo menos dos hemocultivos y de preferencia tres, separados por media hora entre cada toma.
- 3.- El aislamiento de *Candida sp* fué superior con el método de frascos de CST que con el de L-C (isolator). Contrario a lo que informa la casa comercial de L-C (isolator).
- 4.- Se observó que la neoplasia que presenta un mayor número de bacteremias es la leucemia linfoblástica aguda.
- 5.- La *Escherichia coli* fué la bacteria con un porcentaje mayor de aislamiento para ambos métodos.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bates D. W., Goldman L., Contaminant blood cultures and resource utilization. *Jama*, Jan 16 1991; 265.
- 2.- Bille J., Randall S. Clinical evaluation of the Lysis centrifugation blood culture system for the detection of fungemia and comparison with conventional biphasic broth blood culture system, *J. of Clin. Microbiol.* 1984; 126:128.
- 3.- Brown A. E., Neutropenia, fever and infection. *Am. J. Med.* 1984; 16:421-428.
- 4.- Ernest Jawetz Joseph I. Melnick, Eduard A. Adalberg, MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA, ed. El manual moderno, Mex. 1981.
- 5.- Flourmog D. J., Adking L., Understanding the blood culture report. *Am. J. Invt. Dis.* 1986, 14:41-44.
- 6.- Halminton, M. Rose B. DIAGNOSTICO CLINICO, ed. Nueva editorial interamericana, Mex. 1985.
- 7.- Harrison. PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA, ed. Interamericana, Mex. 1991.
- 8.- Harry R., Wang M., Evaluation of isolator system and large-volume centrifugation method for culturing body fluids, *J. Clean Microbiol.* 1991:124-125.
- 9.- James W. Mayo MD., Rates of hospital-acquire bloods stream infections in patients with specific malignanci, cancer; 1982:187-190.
- 10.- Jeffrey J., Guillot C., Clinical comparison of yhe resing-containing Bactec 26 plus and the isolator 10 blood culturing systems, *J. Clin. Microbiol.* 1991:2245-2249.
- 11.- Jiro I., Rodriguez Y., Causes of death in cancer patients, *Cancer*. 1974:568-573.
- 12.- Klastersky J., Concept of empiric therapy with antibiotic combinations, *J. Med.* 1986;30:2-12.
- 13.- Lowells, Young MD., Nosocomial infections in the immunocompromised adult, *Am. J. Med.* 1987;70:398-403.
- 14.- Melvin P., Stanley M., Controlled evaluation of Bactec plus 26 and Roche septi-check aerobic blood culture bottles, *J. of Clin. Microbiol.* 1991:879-882.

- 15.- Meunier F., Acun M., *Candidemia in immunocompromised patients*, Clin. Infect. Dis. 1992;14:suppl 120-122.
- 16.- Patrick R. Murray A., *Clinical comparison of the recoveries of bloodstream pathogens in septi-check brain heart infusion broth with saponin, septi-check tryptic soy broth, and the Isolator lysis-centrifugation system*, J. of Clin. Microbiol. 1991:901-905.
- 17.- Patrick R., Murray, *Comparison of the lysis-centrifugation and agitated biphasic blood culture system for detection of fungemia*, J. Clin. Microbiol., 1991:96-98.
- 18.- Richard B. Shirley J., *Contamination cultures processed with the Isolator Lysis-centrifugation blood culture tube*, J. of Clin. Microbiol., feb 1984:97-99
- 19.- Ruth H. Brean W., *Fungemia in cancer: Changing frequency, earlier onset, and results of therapy*, Rev. of Infect. Dis. Vol 7,7, 1985:646-654.
- 20.- Roberts F.J., Gereare A., *Thres-year study of positive blood cultured with emphasis*, Rev. of Infect. Dis. 1991:34-34.
- 21.- Stephen C., Schimpff *overview empiric antibiotic therapy for the febrile neutropenia patients*, Rev. of Infect. Dis. 1985:7 suppl.
- 22.- Washington J., *Blood culture issues and controversies*, Rev. Infect. Dis 8;5 1986:792-802.
- 23.- Wingard J, Jhon R., *Diferences between first and subsequent fevers during prolonged neutropenia cancer*, 59, 1987.
- 24.- Whimby E, Timothy E., *Bacteremia and fungemia in patients with neoplastic disease*, Am. J. Med. 1987;82:723-730.
- 25.- Youmans G., Paterson Y., Sonumers H., *MANUAL DE INFECTOLOGIA*. Nueva editorial Interamericana. Mex. 1982.