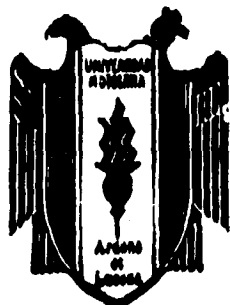


302827

4
24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

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

COMPARACION DEL SISTEMA BACTEC NR-730 CON
SUBCULTIVOS DEL METODO CONVENCIONAL
BIFASICO HEMOLYNE-BIOMERIEUX PARA LA
DETECCION DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

EMMA ANGELICA DAVALOS RIOS

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Doy Gracias a mis Padres por el apoyo que me brindaron a lo largo de toda mi carrera y por los sacrificios que esto significó para ellos, a mi familia que siempre pude contar con todo su apoyo.

Gracias muy especiales a Rosario Vázquez que sin ella esto no hubiera sido posible así, como también le agradezco de todo corazón al Dr. Eduardo Rivera Martínez, la paciencia que siempre tuvo.

Un Agradecimiento muy especial, por todo el cariño y apoyo brindado en los momentos más difíciles, dedicando este trabajo a una persona importante Jorge Ortega.

El Obstáculo más grande	El miedo
El mayor error	Darse por vencido
La mejor distracción	El trabajo
El sentimiento más vil	La envidia
El regalo más hermoso	El perdón
Lo más maravilloso del mundo	El amor
La felicidad más dulce	La paz
El día más bello	¡Hoy!

El presente trabajo se realizo en el Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez ", bajo la dirección del McM.Dr. Eduardo Rivera Martínez y la Q.F.B. Rosario Vázquez Larios.

VICTOR: en memoria de un niño.

En memoria de un niño que se hizo presente a través de sus acciones y de sus pensamientos.

Un niño que se hizo hombre a fuerza de sufrimientos que, sin embargo, supo enfrentarse con mucha entereza, fuerza y, por supuesto, valentía.

Un niño que supo siempre dejar en el corazón de todos un gran ejemplo de esperanza y lucha.

Un niño que supo elegir el lugar y el momento para darnos una obra de experiencia genial, por lo vasto de su horizonte y la extensión de sus aplicaciones.

Un niño que con sus hechos, su conducta y su amor, nos ha permitido le recordemos eternamente.

Un niño que nos ha dejado una gran reflexión de vida en las manos y, que en su nombre, nosotros hemos de aprovechar.

No he de pedir que no lloren, pero lo que pido en su nombre, es que cada una de esas lágrimas derramadas por todos, sean un pequeño lazo de amor y de unión, hacia un tierno y muy grato recuerdo de un ser que nunca podremos dejar de recordar.

¡No ha de morir quien vive dentro de ti!

INDICE.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Hipòtesis	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de bacteriemias	3
2.2. Generalidades de hemocultivos	4
2.2.1 Factores que influyen en la velocidad de recuperaci3n de recuperacion de los microorga_ nismos	4
2.3. M3todo de diagn3stico	7
2.4. Sistema no radiom3trico BACTEC	8
2.5. M3tabolismo microbiano	9
2.5.1 Principales v3as metab3licas de los carbohidratos	9

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diagrama de flujo	11
3.2. Material de Laboratorio, medios de cultivo, reactivos y equipo	13
3.2.1 Material biológico	13
3.2.2 Medios de cultivo	13
3.2.3 Equipo	15
3.2.4 Varios	15
3.2.5 Sistemas comerciales	15
3.3. Metodología	15
3.3.1 Diseño de estudio	15
3.3.2 Toma de la muestra y volumen de inoculación	16
3.3.3 Procedimiento para los hemocultivos bifásico de Ruíz Castañeda (Hemolyne-BioMérieux)	16
3.3.4 Procedimiento para la lectura de los hemocultivos del Sistema BAC-TEC NR-730	17
3.3.5 Identificación de los microorganismos aislados de los hemocultivos positivos	18

3.3.6 Analisis estadístico	18
----------------------------	----

CAPITULO IV

4.1. Resultados	19
-----------------	----

4.2. Discusión	20
----------------	----

CAPITULO V

Conclusiones	25
--------------	----

Bibliografía	26
--------------	----

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La detección temprana de bacteriemias es de suma importancia, ya que ocupan un lugar muy importante dentro de las enfermedades infecciosas y son padecimientos que con frecuencia ponen en peligro la vida de los pacientes.

Para la detección del crecimiento bacteriano en hemocultivos, existen dos sistemas: los convencionales y los automatizados. Los sistemas convencionales requieren de subcultivos para la detección del desarrollo de agentes etiológicos mientras que los sistemas automatizados utilizan métodos bioquímicos.

De los sistemas automatizados, uno de los más utilizados es el denominado BACTEC de Becton Dickinson, el cual presenta tres diferentes versiones: el radiométrico, el espectrofotométrico y el de fluorescencia (7,11). Estos sistemas detectan el CO₂ producido por el metabolismo microbiano que se traduce como índice de crecimiento de estos agentes.

En el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICh) hasta el año de 1992, se utilizaron hemocultivos bifásicos de Ruiz-Castañeda (Hemolyne-bioMérieux) para la detección de bacteriemias; sin embargo, la necesidad de realizar varios subcultivos para la detección de hemocultivos positivos que requerían mayor tiempo; obligó a cambiar a un método automatizado.

Con la finalidad de corroborar la sensibilidad, especificidad y rapidez en la detección de hemocultivos positivos ofrecidos por el sistema BACTEC NR-730, se realizó un estudio comparativo entre este y el método convencional bifásico de Ruiz Castañeda (Hemolyne-bioMérieux).

1.2. OBJETIVOS.

- Evaluar el sistema BACTEC NR-730 y el método convencional de Ruiz Castañeda (Hemolyne-bioMérieux)
- Determinar si la sensibilidad y especificidad del método convencional de Ruiz-Castañeda (Hemolyne-bioMérieux) es similar a la del sistema Bactec NR-730 en hemocultivos del INCICH
- Comparar el tiempo necesario para detectar bacteriemias utilizando el sistema Bactec NR-730 y los hemocultivos convencionales de Ruiz-Castañeda (Hemolyne-bioMérieux).

1.3. Hipótesis.

1.3.1. Hipótesis nula.

- El sistema Bactec NR-730 tiene la misma especificidad y sensibilidad que los hemocultivos convencionales de Ruiz Castañeda (Hemolyne-bioMérieux).

1.3.2 Hipótesis alterna.

- El sistema Bactec NR-730 tiene mayor sensibilidad y especificidad que el subcultivo de hemocultivo convencional de Ruiz Castañeda(Hemolyne-bioMérieux).

CAPITULO II

ANTECEDENTES.**2.1. Generalidades de bacteriemias.**

La bacteriemia constituye una de las situaciones más grave en una enfermedad infecciosa.

El término bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre, y puede indicar la existencia de un foco infeccioso como una neumonía o absceso hepático, o simplemente puede presentar la liberación de bacterias a la sangre (7).

Las bacteriemias pueden ser: transitorias, intermitentes y continuas. La bacteriemia transitoria es la entrada breve y rápida de bacterias al torrente sanguíneo por un evento traumático menor; la bacteriemia intermitente es causada por focos infecciosos localizados como abscesos no drenados; y la bacteriemia continua es característica de infecciones intravasculares particularmente de endocarditis bacteriana (2).

Los microorganismos más comúnmente aislados en la sangre son los bacilos gramnegativos, incluyendo a las enterobacterias y pseudomonas; microorganismos que con gran frecuencia se encuentran en el ambiente hospitalario y que colonizan la piel de pacientes generalmente inmunosuprimidos; así como también bacterias grampositivos como son los estafilococos, que con el continuo aumento de empleo de catéteres intravenosos y líneas intraarteriales, cada vez se encuentran con mayor frecuencia como causantes de bacteriemias. (10)

2.2. Generalidades de hemocultivos.

En diversas enfermedades los hemocultivos, nos proporcionan la única forma inmediata de aislar e identificar al agente causal y el diagnóstico etiológico depende entonces de que los hemocultivos sean practicados cuidadosa y adecuadamente. El rápido aislamiento, identificación y susceptibilidad de los microorganismos de los hemocultivos aporta información que es de gran importancia para el adecuado tratamiento de estos pacientes.

2.2.1. Factores que influyen en la velocidad de recuperación de los microorganismos.

Los factores que intervienen en la velocidad y tasa de recuperación de los microorganismos en las bacteriemias, se citan en el tabla 1 (7).

Tabla 1. Variables que afectan la velocidad y tasa de recuperación de los microorganismos en los sistemas de hemocultivos.

Frecuencia de las muestras.
Dilución medio de cultivo -sangre (1:5 o 1:10)
Medios de cultivo (medios enriquecidos)
Anticoagulantes y resinas
Incubación (temperatura, atmósfera y tiempo)

a) Frecuencia de las muestras de sangre.- Cuando las bacteriemias son continuas los hemocultivos pueden ser tomados a diferentes

intervalos de tiempo sin embargo en los casos de bacteriemia intermitente la toma del hemocultivo al ser espaciada por intervalos de tiempo de 15 a 30 minutos favorece la probabilidad de aislamiento del agente causal.

b) **Volumen.**- La probabilidad de aislar un microorganismo aumenta proporcionalmente con el volumen de sangre tomada. En los niños, especialmente en lactantes, no es posible tomar muestras mayores de 3 ml; sin embargo, los lactantes con bacteriemia tienen un número mayor de bacterias por mililitro de sangre que el adulto, por lo que con sólo de 1 a 3 ml de muestra es suficiente para lograr el aislamiento del microorganismo en la mayoría de los casos. Sin embargo en los adultos, son necesarios de 8 a 10 ml por muestra de hemocultivo (2).

Un factor importante que debe tenerse en cuenta es la dilución de la sangre en el medio, se ha encontrado que la relación 1:10 (1:5 como mínimo) de sangre en el medio es la más conveniente. La dilución de la muestra de sangre en el medio de cultivo reduce los mecanismos de inmunidad celular y humoral del huésped favoreciendo el aislamiento de los microorganismos; sin embargo, ciertas bacterias son inhibidas por el suero humano aún después de diluir 20 veces la sangre con el medio de cultivo. Con frecuencia los hemocultivos se diluyen sólo 10 veces lo que puede ser insuficiente en algunos casos para impedir que continúe la acción de anticuerpos y complemento sobre los microorganismos susceptibles. Por otro lado, una dilución de sangre en medio de cultivo en proporción de 1:10 puede ser suficiente para eliminar el efecto de pequeñas cantidades de antibióticos sobre los microorganismos.

c) **Medios de cultivo.**- La mayoría de los hemocultivos comerciales contiene digerido pancreático de soya, infusión cerebro corazón, peptona suplementada o caldo tioglicolato; siendo los medios más enriquecidos los caldos Columbia y Brucella.

d) **Aditivos.**- El desarrollo de bacterias que carecen de pared celular se favorece mediante el uso de estabilizadores osmóticos como sacarosa, manitol o sorbosa, creando un medio hipertónico.

El anticoagulante presente en el medio no debe actuar sobre⁵ las bacterias y debe evitar la coagulación de la sangre que podría atrapar a las bacterias e impediría su detección; el más utilizado es el polianetol sulfonato de sodio (PSS) al 0.025%- 0.03 %; además de su acción anticoagulante, tiene un efecto anticomplementario y antifagocítico que reduce la destrucción intracelular de las bacterias por neutrófilos. Se ha observado que el PSS inhibe el desarrollo de ciertas bacterias anaerobias y ocasionalmente de ciertas cepas de *Neisseria meningitidis*; en los casos en los que esto es un problema se utiliza otro anticoagulante no tóxico para dichos microorganismos. El anilo sulfato de sodio (ASS) ó el agregado de gelatina al 0.2% anula la acción inhibitoria del PSS.

Asimismo puede agregarse penicilinas a los hemocultivos con el fin de inactivar específicamente ciertas penicilinas y otros antibióticos del grupo de los β -lactámicos que pueden estar presentes en el suero del paciente.

El empleo de penicilinas ha sido reemplazado en los últimos años por el empleo de resinas que inactivan en forma no selectiva a la mayoría de los antibióticos adsorbiéndolos a la superficie de sus partículas, varios estudios han demostrado que el aislamiento

de los patógenos de los pacientes que reciben terapia con antibióticos es más rápido y efectivo al utilizar estas resinas.

2.3. Métodos de diagnóstico.

Existen dos tipos de métodos de diagnóstico para la detección de hemocultivos positivos: convencionales y no convencionales.

i) **Métodos convencionales.**- El medio bifásico de Ruiz-Castañeda es el más utilizado, contiene medios de cultivo con diferentes fórmulas enriquecidas que permiten la detección de la mayoría de los microorganismos.

ii) **Métodos no convencionales.**- Existen varios métodos que se describen a continuación:

a) **Lisis centrifugación.**- Este sistema que se encuentra en el comercio bajo el nombre de ISOLATOR (Dupont de Nemours and Co.), el cual consiste en un tubo con doble tapón que contiene saponina para lisar las células sanguíneas, propilenglicol para disminuir la espuma, polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante y el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) para precipitar los iones calcio y así inhibir la cascada del complemento y la coagulación. Una vez finalizada la centrifugación se desecha el sobrenadante y el sedimento que contiene a los microorganismos se agita vigorosamente en un vortex y el sedimento se inoculara en su totalidad en placas de agar (4,7).

b) **Subcultivo incluido.**- Una modalidad del sistema bifásico, es el sistema Septi-check que consiste en una botella convencional para hemocultivo a la cual se ha unido una cámara que contiene una lámina de vidrio con tres caras cubiertas de agar chocolate, agar

MacConkey y malta respectivamente; para realizar el subcultivo se invierte la botella poniendo en contacto el caldo con la superficie de los tres medios de cultivo, permitiendo una detección mucho más rápida de los microorganismos (4,7,13).

c) **Sistemas automatizados.**- En la actualidad la mayoría de los laboratorios emplean un sistema automatizado. En el comercio existen diversos tipos de sistemas, los cuales utilizan la radiometría, la espectrofotometría o la fluorometría para la detección de CO₂ producto del metabolismo microbiano, como indicador de positividad de los hemocultivos (3,4,5).

2.4 Sistema no radiométrico BACTEC.

En 1984, los laboratorios Johnston dieron a conocer un analizador de hemocultivos que detectaba el CO₂ producido por el metabolismo microbiano por espectrofotometría infrarroja (BACTEC NR), para reemplazar los medios de cultivo con sustratos radioactivos.

Los hemocultivos BACTEC cuentan con medios de cultivo enriquecidos, además del polianetol sulfonato de sodio (como anticoagulante) y las resinas que inactivan a los agentes antimicrobianos (4).

El sistema selecciona el gas de cultivo adecuado para reemplazar el volumen de gas removido por el instrumento en el análisis. La bomba neumática transfiere el gas al sistema de medición donde la concentración de dióxido de carbono (CO₂) es medida por espectrofotometría infrarroja. Esta cantidad es convertida a un número llamado valor de crecimiento, el cual representa la cantidad de CO₂ sobre el gas de cultivo de

referencia. Entre más alto sea el contenido de CO₂, más alto será el valor de crecimiento leído en cada frasco con el valor del umbral previamente definido para determinar hemocultivos positivos. Cualquier lectura que exceda estos valores del umbral es considerada significativa (4,9)

2.5 METABOLISMO MICROBIANO.

La función del metabolismo microbiano consiste en mantener y sintetizar los componentes celulares, que constan de macromoléculas las cuales pueden formar los microorganismos a partir de la mayoría de todos los compuestos orgánicos. Para ello, es necesario que los microorganismos degraden las biomoléculas y las conviertan en sustancias aprovechables. Esto último, los microorganismos lo realizan al igual que otros seres vivos a través de vías metabólicas. Existen numerosos sustratos que pueden metabolizar los microorganismos, pero la glucosa puede ser utilizada por casi todos los microorganismos y tiene gran importancia como sustrato energético para la biosíntesis y su utilización depende de la presencia o ausencia de las enzimas que intervienen en las secuencias específicas de cada reacción.

2.5.1. Principales vías metabólicas de los carbohidratos.

El modelo general para el uso de todos los hidratos de carbono es su paso por un número reducido de vías centrales para el catabolismo de unos cuantos azúcares-fosfato claves. Las enzimas de estas vías degradan los azúcares-fosfato a compuestos de bajo peso

molecular, principalmente piruvato, acetato y dióxido de carbono. El piruvato raramente se acumula como un producto y es metabolizado a productos de fermentación o productos oxidados y posteriormente a CO_2 y H_2O . (10)

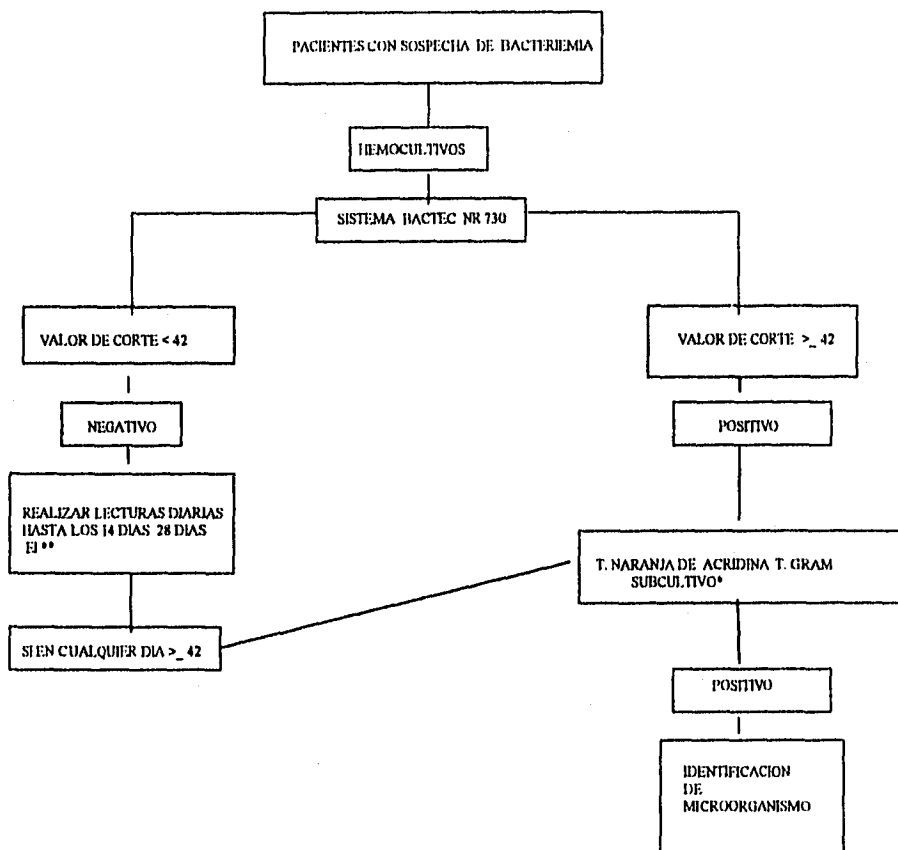
Los microorganismos realizan las siguientes vías catabólicas para la glucosa:

- a) Vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas.
- b) Entner-Doudoroff.
- c) Vía de la pentosa-fosfato
- d) Vía de fosfocetolasa
- d) Ciclo del ácido tricarbóxico.

CAPITULO III

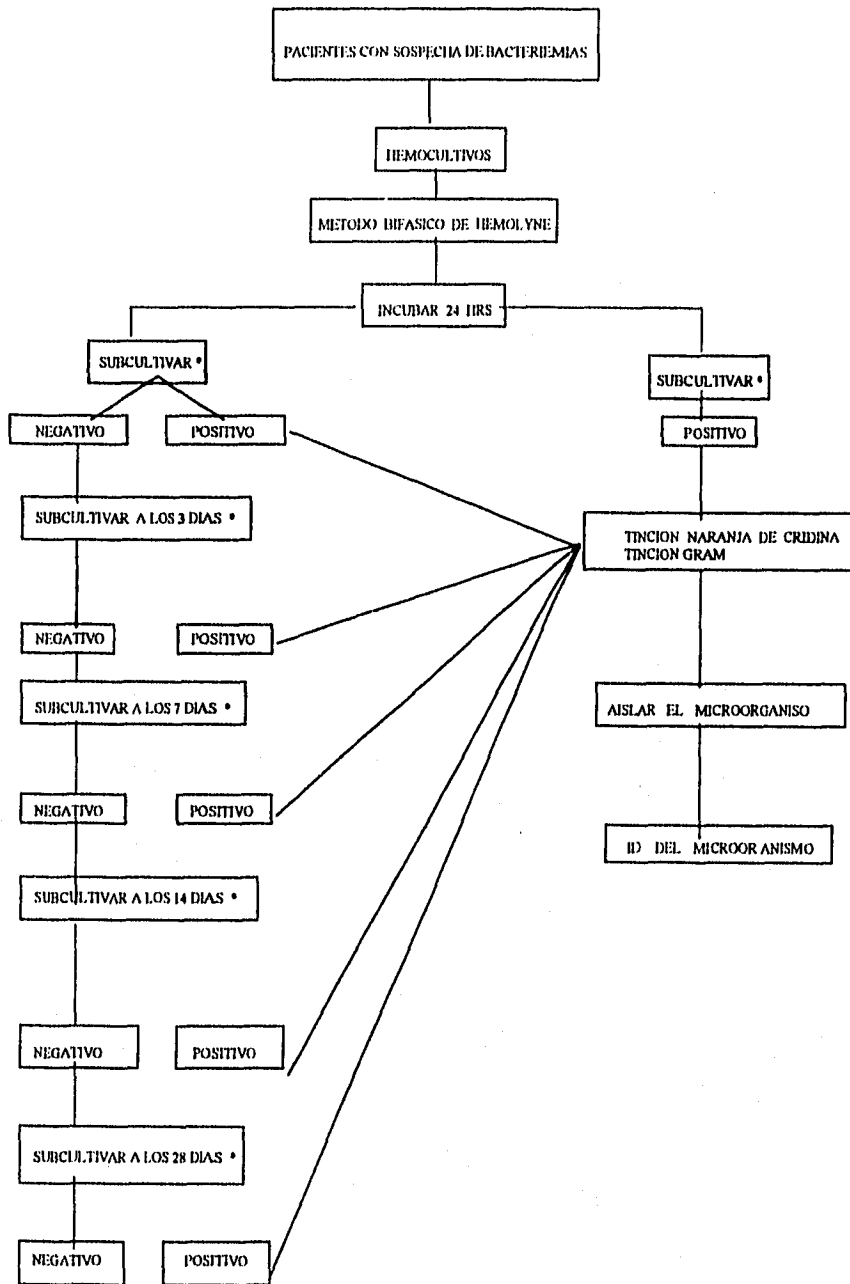
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de Flujo.



** Hemocultivos negativos con sospecha de E.I. o Brucelosis.

* En medios Mac Conkey, Agar Sangre, Agar Chocolate



* En medios Mac Conkey, Agar Sangre, Agar hocolate

3.2. 3.2.MATERIAL DE LABORATORIO, MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1. Material biológico.

Se utilizaron 4605 muestras de hemocultivos provenientes de pacientes del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" correspondientes al periodo de septiembre de 1992 a mayo del 1993.

3.2.2. Material de laboratorio.

Portaobjetos.

Cajas petri

3.2.3. Medios de cultivo.

i) Generales:

Gelosa sangre

Gelosa chocolate

Agar MacConkey

ii) Especiales:

1. Frasco de cultivo Bactec Plus 26 y Bactec Peds plus (25 ml).

Agua desmineralizada

Caldo de soya - caseína

Extracto de levadura

Dextrosa

Sacarosa

Hemina

Menadiona

Polianetolsulfonato de sódio

Piridoxonal HCl [vitamina B₆]

Resina adsorbente no iónica
Resina de intercambio catiónica.

2. Frasco de hemocultivos del sistema Hemolyne (Ruíz-Castañeda) (80 ml).

a) Fase líquida.

bio-Trypcase
bio-Gélytone
Extracto de levadura
Glucosa
Cloruro sódico
L- Arginina
Piruvato sódico
Hemina
Menadiona [vitamina K₃]
Clorhidrato de piridoxonal [vitamina B₆]
Nicotinamida adenin dinucleótido
Polianetol sulfonato de sodio
Bicarbonato sódico
Tris [hidroximetil] aminometano

b) Fase sólida

bio-Tripcase
bio -Gélytone
Extracto de levadura
Glucosa
Cloruro sódico
L- Arginina
Piruvato sódico

Hemina
Menadiona [vitamina K₁]
Tris [hidroximetil] aminometano
Agar + heteropolisacárido

3.2.4. Equipo.

Incubadora de CO ₂	Heraeus
Incubadora	Heraeus
Incubadora-Agitadora	Lab-Line
Microscopio	Karl-Zeiss
BACTEC NR-730	Becton Dickinson

3.2.5. Varios.

Equipo para tinción de Gram.

3.2.6. Sistema comercial para identificación .

- a) Panel Combo positivo 6 MicroScan Baxter Diag. Inc.
- b) Panel Combo negativo 2 MicroScan Baxter Diag. Inc.

3.3. METODOLOGIA.

3.3.1. Diseño del estudio.

Cada muestra de sangre recolectada de pacientes con sospecha de bacteriemia, fue inoculada en un frasco de hemocultivo del sistema BACTEC y en un frasco de Hemolyne e incubados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante a 37°C, los del sistema BACTEC en agitación a 150 RPM y los del sistema Hemolyne en forma estática.

Partiendo de la premisa que cualquiera de las tres tomas de una serie de hemocultivos tiene la misma probabilidad de ser positiva tanto en bacteriemias intermitentes y aun más en bacteriemias continuas; a los pacientes con sospecha de bacteriemia se les tomaron tres muestras de sangre de 10 ml cada una y al menos una de las tres, sin importar cual de ellas, fue inoculada en un frasco de hemocultivo del sistema Hemolyne y se tomó como par la muestra más cercana en tiempo inoculada en frasco del sistema BACTEC.

3.3.2. Toma de la muestra y volumen de inoculación.

1. Tomar las muestras en las condiciones de asepsia recomendadas por la American Society for Microbiology.
2. Inocular con 10 ml de sangre a cada uno de los frascos de hemocultivos Hemolyne y BACTEC.

3.3.3. Procedimiento para los hemocultivos bifásico de Ruiz Castañeda (Hemolyne-BioMérieux).

1. Efectuar una preincubación del frasco hemocultivo a 37°C durante mínimo de 4 horas en posición horizontal para inundar el agar con el caldo.
2. Incubar a 37°C en posición vertical durante 14 días y en caso de sospecha de endocarditis o brucelosis hasta 28 días.
3. Efectuar subcultivos de los hemocultivos en gelosa sangre, gelosa chocolate y agar de MacConkey a las 24 hrs. En caso negativo, reincubar y efectuar nuevos subcultivos a las 72 hrs y posteriormente a los 7, 14 y 28 días.

4. Diariamente, efectuar una inspección visual de los frascos durante el periodo de incubación establecido, observando si aparecía turbidez o hemólisis en el caldo y si había desarrollo de colonias en la fase sólida.

5. Efectuar un subcultivo de los frascos positivos en gelosa sangre, chocolate y agar MacConkey.

6. Preparar un portaobjetos teñido mediante la tinción de Gram.

7. Observar el frotis, para investigar la presencia de microorganismos (10).

3.3.4. Procedimiento para la lectura de los hemocultivos por el sistema Bactec.

1. Analizar los hemocultivos aerobios dos veces al día en las primeras 48 horas y una vez al día durante los siguientes 7 días y nuevamente a los 14 días, en caso de sospecha de endocarditis infecciosa al concluir 28 días.

2. Realizar únicamente una lectura diaria, en el caso de los hemocultivos anaerobios durante los primeros 7 días, a los 14 días y en caso de sospecha de endocarditis infecciosa al concluir los 28 días.

3. Examinar los frascos a simple vista, antes de efectuar cualquier análisis con el instrumento, a fin de detectar posibles indicios de crecimiento como abombamiento de la tapa, turbidez del medio o hemólisis del mismo.

4. Efectuar un subcultivo de los frascos positivos en gelosa sangre, chocolate y MacConkey.

5. Preparar un portaobjetos teñido mediante la tinción de Gram, de los frascos de hemocultivos BACTEC 26 y 27 que tuvieron lecturas iguales o mayores de 42; y en los PEDS PLUS la lectura considerada fue igual o mayor de 30, y que por lo tanto se consideran hemocultivos positivos. En este punto, también es importante tomar en cuenta los incrementos (delta) de estos valores en los intervalos de los días, para detectar posibles hemocultivos positivos; el criterio de delta GV para la detección de una muestra positiva se define como un cambio en el valor de crecimiento (GV) del orden de 10 a 20 unidades entre dos lecturas consecutivas.

6. Observar el frotis, para investigar la presencia de microorganismos.

3.3.4. Identificación de los microorganismos aislados de los hemocultivos positivos.

1. Los microorganismos aislados de hemocultivos positivos fueron identificados por el sistema automatizado MicroScan, que se basa en métodos bioquímicos convencionales (1).

3.3.5. Análisis estadístico.

Se analizaron los resultados comparando el número de positivos y negativos mediante tablas de contingencia de 2 X 2 efectuando χ^2 con corrección Yates y prueba de concordancia de Kappa.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS.

Durante el periodo de estudio se recibieron 4605 hemocultivos, de estos 327(71.0%) fueron considerados causantes de bacteriemias reales; 184 cepas fueron recuperadas por el sistema de hemocultivos BACTEC NR-730 y 143 aislamientos por el método bifásico de hemocultivos Hemolyne-BioMérieux [77.9% y 60.33% de positividad respectivamente $p < (0.001)$; y por ambos métodos 102 cepas (2.2%).

La frecuencia de microorganismos contaminantes fue de 1% en el sistema BACTEC y de 3.2% en HEMOLYNE incluyendo en estos microorganismo a los estafilococos coagulasa negativo y corynebacterias.

En la tabla 1 se muestra la cantidad de microorganismos aislados de ambos sistemas observandose que para el grupo de los bacilos gramnegativos como Escherichia coli, (6 BACTEC y 3 HEMOLYNE) Pseudomona sp (7 BACTEC y 3 HEMOLYNE) y para el grupo de los cocos grampositivos como Staphylococcus aureus (15 BACTEC y 5 HEMOLYNE) y Staphylococcus aureus (13 BACTEC y 9 HEMOLYNE), el aislamiento fue significativamente mayor en el sistema de hemocultivos BACTEC NR-730.

El tiempo promedio de incubación para detectarse como hemocultivo positivo por los dos sistemas analizados se presenta en la tabla 2. En el caso del sistema BACTEC NR-730, el tiempo

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

requerido fue menor que con los hemocultivos de HEMOLYNE, siendo de 34.00 hrs. y de 49.00 hrs respectivamente ($p = \leq 0.001$). El tiempo requerido fué más corto en el aislamiento de *Candida sp*; *Pseudomona sp*; y *Corynebacterias*.

4.2 DISCUSION

Los hemocultivos son probablemente los exámenes más importantes que se realizan en el laboratorio de microbiología clínica, no solamente por la importancia de la identificación del microorganismo, sino por la selección antimicrobiana que se puede realizar en base a un resultado preliminar.

Durante los últimos años, se han desarrollado varios sistemas de hemocultivos, teniendo como variaciones entre ellos, la metodología que utilizan para detectar el crecimiento microbiano, el tipo de medio de cultivo, los suplementos, el factor de dilución entre cultivo-sangre y las condiciones de incubación. Dentro de estos sistemas se encuentran el sistema BACTEC NR-730 de Becton Dickinson, que detecta el CO₂ generado por el metabolismo de los microorganismo por espectrofotometría infraroja.

En el estudio realizado se compararon los sistemas de hemocultivos BACTEC NR-730 y el método HEMOLYNE presentando una sensibilidad y especificidad de 0.93 , 0.99 , 0.80 y 0.997 respectivamente; siendo estadísticamente significativa la diferencia en sensibilidad.

Se ha observado que el sistema BACTEC NR-730 aumenta la frecuencia y la rapidez de recuperación de los microorganismos aislados de bacteriemias por presentar diferencias radicales en comparación a otros sistemas siendo la más importante la agitación constante durante las primeras 48 hrs. (9,16,18).

En el estudio realizado se observó incremento de aislamiento de bacilos gramnegativos como Escherichia coli y Pseudomona sp; asimismo de los cocos grampositivos como Staphylococcus aureus y Streptococcus viridans en el sistema BACTEC, por las razones que a continuación se mencionan: la diversidad de bacterias que pueden ser aisladas de sangre requieren de medios de cultivo que permitan su desarrollo. El medio de cultivo de los hemocultivos BACTEC tiene características que favorecen el desarrollo de la mayoría de las bacterias; el medio de cultivo es hipertónico ya que contiene un estabilizador osmótico (sacarosa) que ayuda a restablecer la pared celular de las bacterias dañadas por los agentes antimicrobianos y la acción del sistema inmune; además, contiene los tioles que favorecen las condiciones de anaerobiosis, disminuyendo el potencial de óxido-reducción, incrementando así la recuperación de los anaerobios facultativos, tal es el caso de los estreptococos del grupo viridans observados en el presente estudio.

Por otro lado, el factor de dilución medio de cultivo-sangre, es uno de los factores más importantes para la recuperación de microorganismos en hemocultivos, ya que neutraliza las propiedades bactericidas de la sangre. Se ha establecido un factor de dilución de 1:5 a 1:10; sin embargo, en los frascos de hemocultivos analizados es diferente; siendo en el BACTEC de 1:2.5 (10 ml de

sangre/25 ml de caldo) y en HEMOLYNE de 1:8(10 ml de sangre/80 ml de caldo); este incremento en la cantidad de sangre inoculada en los frascos de hemocultivos de BACTEC, unido a la presencia de resinas aumenta la frecuencia de aislamientos en el sistema(1,13,18.). Por otro lado, las resinas neutralizan la acción de los agentes antimicrobianos y aumentan la lisis de leucocitos 2 a 4 veces más que en medios que solo contienen PSS (1,11,13,18).

En relación, a la diferencia presentada por ambos sistemas en el tiempo para determinar el hemocultivo como positivo, así como la frecuencia de microorganismos aislados a las 24 y 48 horas por el sistema BACTEC es favorecido por la agitación a la que se someten los frascos de hemocultivos durante las 48 horas iniciales en este sistema, lo cual, incrementa notablemente la rapidez en la recuperación de los microorganismos porque aumenta la lisis de los leucocitos que contienen los microorganismos fagocitados, mejorando la exposición del microorganismo a los nutrientes (9,14,15,18,19).

Tabla 1.- Tasa de aislamiento de los microorganismos en hemocultivos BACTEC NR730 y en medios bifásicos HEMOLYNE

MICROORGANISMOS	HEMOLYNE n (%)	BACTEC NR730 n (%)	TOTAL	* IC 95%
Micrococaceae				
<u>S. aureus</u>	9 (69)	13 (100)	13	6 - 50 %
<u>S. epidermidis</u>	11 (78)	11 (78)	14	ND
<u>Estaf. coag. neg.</u>	3 (60)	5 (100)	5	ND
Streptococaceae				
<u>S. viridans</u>	5 (31)	15 (94)	16	37 - 69 %
<u>S. pneumoniae</u>	0 (0)	1 (94)	1	NE
BACILOS GRAMNEGATIVOS FERMENTADORES				
<u>Enterobacter sp.</u>	11 (65)	15 (88)	17	NS
<u>Escherichia coli</u>	3 (50)	6 (100)	6	10 - 90 %
<u>Citrobacter freundii</u>	1 (50)	2 (100)	2	NE
<u>Serratia marcescens</u>	3 (60)	4 (80)	5	NS
<u>Salmonella sp.</u>	2 (66)	2 (66)	3	ND
BACILOS GRAMNEGATIVOS NO FERMENTADORES				
<u>Pseudomona sp.</u>	3 (33)	7 (77)	9	3 - 85 %
<u>Acinetobacter sp.</u>	1 (100)	1 (100)	1	ND
LENTO CRECIMIENTO				
<u>Haemophilus influenzae</u>	0 (0)	1 (100)	1	NE
BACILOS GRAMPOSITIVOS				
<u>L. monocytogenes</u>	1 (100)	1 (100)	1	ND
<u>Corynebacterium sp.</u>	1 (50)	1 (50)	2	NE
ANAEROBIOS				
<u>Propionibacterium sp.</u>	4 (100)	0 (0)	4	NE
<u>Bacteroides fragilis</u>	4 (100)	0 (0)	4	NE
LEVADURAS				
<u>C. albicans</u>	2 (100)	2 (100)	2	ND

I.C. 95% = intervalo de confianza 95%

ND: No hay diferencia, NS: Diferencia no significativa, NE: No evaluable.

TABLA 2.- Tiempo promedio de incubación requerido para la detección de hemocultivos positivos en BACTEC NR-730 y en medios bifásico de HEMOLYNE.

MICROORGANISMOS	HEMOLYNE TIEMPO X (HRS)	BACTEC NR730 TIEMPO X (HRS)
Microcaceae		
<u>S. aureus</u>	24.00	36.00
<u>S. epidermidis</u>	44.00	31.00
<u>Estaf. coag. neg.</u>	42.00	33.00
Streptocaceae		
<u>S. viridans</u>	36.00	35.00
<u>S. pneumoniae</u>	0	24.00
BACILOS GRAMNEGATIVOS FERMENTADORES		
<u>Enterobacter</u>	43.00	32.00
<u>Escherichia coli</u>	24.00	24.00
<u>Citrobacter freundii</u>	36.00	36.00
<u>Serratia marcescens</u>	32.00	30.00
<u>Salmonella sp.</u>	36.00	36.00
NO FERMENTADORES		
<u>Acinetobacter sp.</u>	48.00	24.00
<u>Pseudomonas sp.</u>	64.00	37.00
LENTO CRECIMIENTO		
<u>Haemophilus influenzae</u>	0	48.00
BACILOS GRAMPOSITIVOS		
<u>Listeria monocytogenes</u>	48.00	48.00
<u>Corynebacterium sp.</u>	336.00	72.00
ANAEROBIOS		
<u>Propionibacterium sp.</u>	183.00	0
<u>Bacteroides fragilis</u>	183.00	0
LEVADURAS		
<u>C. albicans</u>	336.00	67.00

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

- * El sistema BACTEC NR-730 tiene mayor sensibilidad, especificidad y rapidez en la recuperación de microorganismos en sangre, que el método bifásico HEMOLYNE-Biomérieux.

- * La diferencia entre los dos métodos es estadísticamente significativa ($p < 0.001$), lo que indica que el sistema BACTEC NR-730 tiene ventajas sobre los métodos convencionales.

- * El permitir un mayor inóculo de sangre (dilución 1:2.5 sangre/medio), el contener aditivos en el medio de cultivo como la sacarosa, los tioles y las resinas; así como la agitación constante durante las 48 horas favorece el crecimiento de los microorganismos en el sistema BACTEC NR-730.

BIBLIOGRAFIA

1. Auckenthaler R., Ilstrup D.M., and Washington J.A., Comparison of Recovery of Organisms from Blood Cultures Diluted 10% (volume/volume) and 20% (volume/volume)., *J.Clin Microbiol.*(1982): 860-864.
2. Balows A., Hausler W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D and Shadomy H.J., *Manual of Clinical Microbiology*. 5a ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1991).
3. Barlett R.C., Elner P.D., Washington J.A., and Sherris J.C., Cumulative technique and procedures in clinical microbiology blood cultures. American Society for Microbiology. Washington D.C. (1974)
4. Brooks K. and Soderman T., Rapid detection of bacteremia by a radiometric System., *Am.J.Clin. Pathol.* 61:859-860.
5. Calvin L., Strand M.P., and Jonas A.S., Bloodstream infection laboratory detection clinical considerations. American Society of Clinical Pathologist. Chicago (1988).
6. Dalton H.P., Kramer J, Allison M.J., Comparison of two blood culture systems. *Am. J.Clin.Pathol.*(1974);61:856-858.
7. De Blanc H, DeLand F, Wagner H., Automated Radiometric detection of bacteria in 2,967 blood culture. *Appl Microbiol* (1971): 22:846-849.

Finegold S.M, Baron E.J, Bailey Scott., Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires (1989).

9. Jane K.M, Gottschall L.R, Schwabe D.L, and Randall L.E., Effect of Agitation and Frequent Subculturing on Recovery of Aerobic and Facultative Pathogens by Roche Seoti- Chek and BACTEC Blood Culture Systems. J.Clin.Microbiol (1987):312-315.

10. Koneman E.W., Stephen D.A., Dowell V.R., Herbert M.S., Diagnóstico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana, México (1985).

11. Larry G.C and James J.P., Influence of a blood culture inoculation technique on detection of bacteremia by the BACTEC Sistem. J.Clin.Microbiol.(1982):590-591

12. Manual de Operación y Mantenimiento, Becton Dickinson Sistemas de Instrumentos para Diagnóstico. BACTEC NR-730. Sept. (1990).

13. Marcelis L., Verhaegen J., Vandeven J., Bosman A., Verbist L., Evaluation of BACTEC high blood volume resin media. Diagn. Microbiol.Infect (1992);15:385-391.

14. Smith E.P., and Hutton N. Value of Extended Agitation and Suculture of BACTEC NR 660 Aerobic Resin Blood Bottles for Clinical Yeast Isolates. J.Clin Microbiol.(1992):3239-3242

15. Silva S.H., and Washington A.J. Optimale Time for Routine Early Subculture of Blood Cultures. *J.Clin Microbiol.*(1980): 445-446..
16. Tarrand J.J., Guillot C., Wenglar M., Jackson J., Lajeunesse D. J., and Rolston K. Clinical Comparison of the Resin-Containin BACTEC 26 Plus and the Isolator 10 Blood Culturing Systems. *J.Clin Microbiol.*(1991): 2245-2249.
17. Washington J.A., Blood Cultures. *Rev.Infect. Dis.* (1986):8(5):792-802.
18. Weinstein M.P., Mirrett S., Wilson M.L., Lizzie J.H., Stratton C.W. and Borth L.R., Controlled Evaluation of BACTEC plus and Roche Septi-Check aerobic blood culture bottles. *J.Clin.Microbiol.* (1991);29:879-882.
19. Weinstein M.P., Mirrett S., and Reller Barth L., Comparative Evaluation of Oxoid Signal and BACTEC Radiometric Blood Culture Systems for the Detection of Bcteremia and Funfemia. *J.Clin.Microbiol.* (1988): 962-964.
20. Wilson M.L.,Wienstein M.P., Reimer L.G., Mirret S.and Reller B., Controlled Comparison of the Bact/Alert and BACTEC 660/730 Nonradiometric Blood Culture Systems. *J. Clin. Microbiol.* (1992);30:323-329.