



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y EL MÉTODO DIRECTO CON EL USO DEL SISTEMA VITEK2 PARA LA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS, A PARTIR DEL CULTIVO POSITIVO DETECTADO EN EL VIAL BACTEC”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PATRICIA MIRANDA ARIAS

ASESOR: DRA. Judith Miriam Bobadilla del Valle



MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2015.



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que instruye a sus alumnos a ser un buen papel dentro y fuera de ella.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por darme la oportunidad de formar parte del equipo, como trabajadora y como tesista, en particular al departamento de Microbiología, lugar donde se llevó a cabo el presente trabajo.

DEDICATORIA

A dios que me ha bendecido con una gran familia, mis padres Josefina Arias Cornejo y Eulogio Miranda Juárez que son a quienes más amo en esta vida y que me impulsan a seguir adelante, y a mis hermanos a quienes adoro con todo el alma.

A los profesores que me han dado las herramientas no solo para mi vida profesional, sino para la vida misma.

A la Dra. Miriam Bobadilla y al Profesor Ernesto Maravilla por guiar este trabajo, y al equipo de microbiología del INCMN "Salvador Zubirán" que me han enseñado mucho.

A mis amigos que forman parte de mi familia.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN	5
2.	MARCO TEÓRICO.....	8
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4.	JUSTIFICACIÓN.....	28
5.	HIPOTESIS.....	28
6.	OBJETIVOS	28
7.	MÉTODO.....	29
8.	RESULTADOS	34
9.	DISCUSIÓN.....	41
10.	CONCLUSIONES	51
11.	ANEXO	52
12.	REFERENCIAS.....	65

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de sangre (hemocultivo) es un examen microbiológico que ayuda a confirmar la invasión del sistema circulatorio por microorganismos como bacterias u hongos. Este consiste en la recuperación de cualquier microorganismo cultivable a partir de muestras sanguíneas las cuales se obtienen de forma periférica o del catéter. La identificación y susceptibilidad rápida de gérmenes causantes de infecciones graves tales como la bacteriemia son relevantes para el diagnóstico acertado y la evolución conveniente del paciente durante su tratamiento.

El cultivo de sangre es crucial cuando se presenta una septicemia, esto es cuando los microorganismos se multiplican a una velocidad a la cual el huésped no puede responder, y por lo tanto la vida del paciente está comprometida. La recuperación de esta infección depende en gran medida del tratamiento que reciba el paciente, generalmente el tratamiento inicial es empírico a los patógenos más probables y a los patrones típicos de sensibilidad, pero en caso de que el tratamiento elegido no sea el adecuado es de suma importancia la rápida identificación y sensibilidad de los microorganismos para corregir el tratamiento.

Desde los años 60's han estado evolucionando los sistemas automatizados con la finalidad de obtener un resultado en el menor tiempo posible, por un lado tenemos a los sistemas que detectan el crecimiento bacteriano como aquellos que identifican el microorganismo de que se trata y también realizan las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.

El sistema BACTEC 9240 detecta eficientemente cultivos positivos, sin embargo, las resiembras subsecuentes en placas de agar para el desarrollo bacteriano son necesarias para realizar la identificación y susceptibilidad por los métodos

convencionales, todo el procedimiento consume hasta 72 horas. Existen diferentes estudios que han informado que si se realiza la identificación y las pruebas de susceptibilidad directamente del cultivo positivo en los frascos (método directo) al sistema de identificación se pueden obtener los resultados el mismo día.

El sistema automatizado VITEK 2 (bioMérieux, Inc. USA) se ha utilizado por varios años para la identificación y susceptibilidad de bacterias, mostrando resultados confiables, exactos y reproducibles. Así mismo, estos sistemas se han probado en forma independiente, para la identificación y susceptibilidad por el método directo mostrando resultados confiables^{3, 12, 35, 42}.

En el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de la Nutrición SZ, las muestras de sangre y líquidos corporales, se cultivan en frascos con medio líquido y se incuban en el instrumento BACTEC 9240. El porcentaje de positividad de estos cultivos es de 9-11%. Con el fin de obtener resultados de identificación y susceptibilidad rápidas pero sobre todo confiables, en este estudio se compara la concordancia entre la identificación y susceptibilidad realizada por el método directo y por el método convencional.

El método directo consiste en hacer un concentrado bacteriano el cual es inoculado en las tarjetas de identificación Vitek (equipo automatizado para identificación y sensibilidad) mientras que en el método convencional primero se siembra en placas de agar y se incuban 24 horas para el crecimiento bacteriano. En este trabajo se incluyeron líquidos estériles como el líquido peritoneal, ascitis, líquido de diálisis, articular etc., dichos líquidos son analizados en microbiología como hemocultivos, ya que se ha observado que la recuperación de microorganismos se mejoran si se siembran en medios líquidos enriquecidos

como lo son los frascos de cultivo BACTEC Peds Plus/F, que si se siembra directamente en placas de agar^{4,21}.

Es importante mencionar que con la observación del cultivo líquido en un frotis teñido por Gram se determina si una muestra puede ser procesada por el método directo o no, ya que para poder hacer la identificación y sensibilidad se debe observar que el cultivo este puro y no tenga flora mixta, pues este último produce resultados erróneos. Al final se analizó la comparación de los dos métodos ya que la exactitud no debe ser sacrificada por tratar de generar un resultado más rápido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BACTEREMIA

En 1863, se había demostrado que las bacterias se pueden desarrollar en el interior de un organismo vivo, Davaine y cols., mostraron que la enfermedad de los becerros conocida en Francia como carbunco era producida por unos bastoncillos encontrados en la sangre. Posteriormente, Vulpian quien fue uno de los promotores de la bacteriología en esos tiempos demostró que la sangre pútrida de buey inoculada en conejos y cobayos, producía septicemia. Vulpian, creó el término de "bacteriemia" para designar la presencia de bacterias en la sangre en 1872, de forma análoga cuando la sangre es contaminada por hongos se conoce como fungemia o por virus se llama viremia¹³.

La invasión de bacterias en la sangre del ser humano se debe a la infección directa del torrente sanguíneo como es el caso de las bacteriemias provocadas por la biopelícula que se forma en la punta de los catéteres o por la contaminación de soluciones intravenosas o de forma indirecta desde un punto extravascular lo cual indica que el microorganismo invasor ha sido capaz de romper las barreras de defensa.

Las bacteriemias se dividen en 2 grandes grupos, bacteriemia primaria cuando el sitio de infección está bien relacionado con el acceso vascular y secundaria cuando se presenta después de una infección en un sitio específico.

Sin embargo es más común clasificar la bacteriemia según la forma en que se presenta en el paciente, si la bacteriemia se presenta de manera espontánea o por

episodios menores, se llama transitoria, el ejemplo más común es la infección por cepillarse los dientes, cuando los microorganismos se liberan de forma constante se denomina bacteriemia continua y por último aquellas infecciones de la sangre en las que las bacterias se liberan del foco de infección de forma ininterrumpida se conoce como bacteriemia intermitente, esta se presenta en infecciones en las cuales el microorganismo es liberado al torrente sanguíneo poco a poco, ejemplo de estas son los abscesos no drenados^{16,28}.

Otra forma de clasificación es por el sitio de infección: las bacteriemias que son detectadas dentro de las primeras 48 horas de hospitalización, y que durante este tiempo al paciente no le han hecho algún procedimiento invasivo con riesgo de producir bacteriemia se clasifica como bacteriemia comunitaria, la infección primaria más común de estas bacteriemias son las del tracto urinario principalmente seguidas de la neumonía y de la infección intra-abdominal. Los microorganismos que causan la infección con más frecuencia son *E. coli*, otras enterobacterias seguido de *S. pneumoniae* y *S. aureus*¹¹.

La bacteriemia asociada a cuidados sanitarios, son aquellas que surgen de un procedimiento diagnóstico o terapéutico pero que el paciente no está hospitalizado, los ejemplos más comunes son los pacientes ambulatorios portadores de sondas urinarias, catéteres intravenosos, las bacteriemias en pacientes en hemodiálisis crónica, en diálisis peritoneal y las bacteriemias en pacientes ingresados en residencias de ancianos o centros de larga estancia.

La bacteriemia nosocomial es la más frecuente y afecta a diferentes poblaciones de pacientes, por ejemplo, en los pacientes ingresados en cuidados intensivos, la asociación a una bacteriemia es el uso de catéter intravascular, seguido de algún problema respiratorio, urinario o intra-abdominal, los pacientes con catéter vascular central originan el 75% de las bacteriemias, después le siguen los pacientes quirúrgicos en donde la etiología en estos casos dependen principalmente del tipo de cirugía y de su localización. Los pacientes con quimioterapias tienen también el riesgo de adquirir una bacteriemia porque están inmunosuprimidos, y los pacientes quemados están totalmente expuestos a los organismos intrahospitalarios por lo que la incidencia de bacteriemia es muy elevada. Después de la escarectomía de la quemadura la bacteriemia transitoria es tan frecuente que aparece en el 30% de los procedimientos cuando se realizan después de los primeros 10 días y en el 100% cuando la superficie quemada supera el 80%¹¹.

La bacteriemia se puede presentar con diferentes manifestaciones clínicas según el lugar de infección que tenga el paciente e incluso puede no tener ninguna sintomatología. Las bacteriemias que se desarrollan por efecto de una infección pueden manifestarse con aumento de la frecuencia respiratoria, erupciones hemorrágicas, inflamación de músculos y articulaciones, pérdida de apetito, fiebre, escalofríos, pérdida de interés del entorno, irritabilidad, somnolencia, dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea, sudoración excesiva, e hipotensión. Es muy común que después de una bacteriemia venga una sepsis la cual se caracteriza por la presencia de gérmenes patógenos en cualquier tejido o fluido del organismo

y no exclusivamente en la sangre, por ello puede haber sepsis con o sin bacteriemia⁴⁶.

La sepsis es una infección que cursa con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS del inglés systemic inflammatory response syndrome) y esta puede ser infecciosa o no infecciosa. La sepsis infecciosa se debe al paso de grandes y repetidas cantidades de microorganismos en todo el organismo, que se liberan desde un foco infeccioso, a través de la linfa o de forma intravascular. Los signos y síntomas de la septicemia son fiebre o hipotermia, escalofríos, hiperventilación; la cual conduce a una alcalosis respiratoria por la pérdida excesiva de dióxido de carbono, lesiones cutáneas, alteraciones del estado mental y diarrea. Las manifestaciones más graves son hipotensión o shock, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia de órganos vitales como son el corazón, el hígado, el riñón y el pulmón⁸.

Para los médicos es un gran desafío predecir una bacteriemia de forma oportuna ya que la rapidez con la cual se dé un tratamiento adecuado definirá el pronóstico del paciente. Algunos de los estudios de laboratorio en los que ellos se apoyan son determinación de proteína C reactiva, citología hemática para detectar una linfopenia, determinación de aspartato transaminasa con valores mayores a 40 UI/L acompañado de fiebre mayor a 38.3° C, taquicardia con más de 120 latidos por minuto, escalofríos e hipotensión^{37, 46}.

Existen modelos que incluyen otras pruebas de laboratorio como es la medición de procalcitonina, que tiene la finalidad de predecir la bacteriemia no solo en pacientes hospitalizados sino también en pacientes que están en urgencias, sin embargo el estándar de oro para la confirmación de una bacteriemia es el cultivo

de sangre, para este procedimiento hay que considerar los siguientes puntos: asepsia, volumen de muestra, número de hemocultivos, intervalo entre las extracciones y la elección de los medios de cultivo⁸.

2.2HEMOCULTIVOS

Para la toma de muestra de los cultivos de sangre es de suma importancia llevar una adecuada asepsia con la finalidad de no contaminar o de obtener microorganismos que forman parte de la microbiota normal del organismo, para ello se debe realizar una limpieza con tintura de yodo (yodo en alcohol) o clorhexidina. Las precauciones universales son palpar el lugar de punción antes de realizarla para no contaminar, se limpia la piel en donde se va a llevar a cabo la punción con yodopovidona al 2% y se deja actuar por lo menos 1 minuto, la limpieza debe hacerse del centro a la periferia, posteriormente, se introduce la aguja en la vena y se obtiene un volumen óptimo para la recuperación de los microorganismos^{16, 27, 28}.

Obtener un volumen óptimo para la recuperación de microorganismos en pacientes adultos mayores a veces resulta difícil, sin embargo se ha observado que el volumen de sangre obtenida es el determinante más importante para la recuperación de microorganismos. El número de microorganismos presentes en la sangre de un adulto con fiebre es generalmente de nivel bajo, usualmente menor a 10 UFC/mL e incluso menor a 1 UFC/mL, por lo que si se obtiene un volumen óptimo se puede mejorar la tasa de recuperación por detección y el tiempo relativo de detección es menor. En un estudio en Taiwan se observó que la tasa de recuperación en frascos con 3mL de sangre fue de un 13.3%, para un volumen de

3-7ml fue del 15.02%, y para los frascos con un volumen óptimo de 8 a 10mL aumentó a 17.68% y 14.96% para los frascos que rebasaban los 10mL, como se puede observar entre mayor sea el volumen de sangre la tasa de recuperación es mayor, sin embargo si se rebasa la dilución de sangre:medio de 1:10, la velocidad de crecimiento disminuye e incluso se puede obtener un falso negativo esto se debe a el efecto inhibitorio del complemento, lisozima, fagocitos, anticuerpos y agentes antimicrobianos. Este problema puede resolverse usando anticoagulantes como el polianetolsulfonato de sodio (SPS) que es antifagocítico y anticomplementario, además de resinas adsorbentes contenidas en los medios de cultivo las cuales inactivan las sustancias inhibitorias presentes en la sangre como los antibióticos^{5, 22, 31}.

Generalmente dos pares de hemocultivos (aerobios y anaerobios) son suficientes para obtener un resultado positivo. Más de dos contribuye poco a la probabilidad estadística de obtener un cultivo positivo, y puede llevar al paciente a un estado anémico, pero como ya se había mencionado es importante obtener la cantidad suficiente de sangre, ya que ayuda a proporcionar los nutrientes que las bacterias necesitan para crecer. El intervalo de tiempo para la toma de muestra para los cultivos puede ser solo el que se necesita para preparar el segundo sitio después de que se obtuvo la primero, de modo que un segundo cultivo de sangre se puede obtener en 30 o 60 minutos después del primero.

Extraer la sangre de un dispositivo de acceso venoso (VAD) es controversial, pero generalmente se hace. Un cultivo de un VAD puede sugerir que el catéter es la fuente de infección, si el laboratorio hace cultivos cuantitativos, comparando el rendimiento del VAD y del cultivo de sangre periférica se puede discriminar cual es

la fuente de infección, desafortunadamente este servicio no está disponible en la mayoría de los laboratorios de microbiología. Otro método que puede sugerir el VAD como la fuente de infección es comparar los tiempos en que los hemocultivos extraídos simultáneamente de los sitios periféricos y centrales dan positivos. Si el VAD es positivo 2 horas o más, antes de lo que el frasco del hemocultivo periférico, el VAD es la causa más probable¹⁹.

2.3 AUTOMATIZACIÓN

En las últimas décadas se ha hecho un gran esfuerzo por reducir el tiempo de reporte de un hemocultivo, se han introducido al mercado diferentes sistemas tanto de monitoreo continuo, que se utilizan para la detección de viales con microorganismos viables, como para llevar a cabo pruebas de identificación y sensibilidad a los antibióticos, de ahí los hemocultivos se han clasificado según su metodología en manuales, semiautomatizados y automatizados, la diferencia entre los dos últimos términos es el grado de operación del equipo, sistema mecánico o dispositivo electrónico en el proceso para definir cuando un cultivo de sangre está positivo.

La automatización en Microbiología ocurre a principios de los años 70's con la introducción de los primeros sistemas semiautomatizados para los hemocultivos permitiendo así la determinación temprana de la sensibilidad e identificación de las bacterias. La tendencia hacia la automatización se ha acelerado con la introducción de sistemas automatizados de monitoreo continuo para hemocultivos y los sistemas de identificación y pruebas de susceptibilidad a antibióticos de los microorganismos aislados^{24, 32, 4}. La mejora de estos instrumentos incluye la

expansión de la base de datos, implementación de tecnologías combinadas con el fin de disminuir el tiempo de detección y el mejoramiento del software que provee al laboratorio la interpretación, el almacenamiento y manipulación de datos. El impacto de la automatización de los hemocultivos versus la metodología convencional puede ser evaluado desde 4 puntos de vista: clínico, microbiológico, epidemiológico y económico.

Impacto clínico: la implementación de sistemas automatizados de hemocultivos con monitoreo continuo, ha aumentado la rapidez de detección disminuyendo el tiempo para iniciar el proceso de identificación del agente etiológico y las pruebas de susceptibilidad, dando una respuesta más rápida a los clínicos, quienes tendrán más herramientas para descartar o confirmar una bacteriemia, y por su puesto la terapia será más dirigida.

Impacto microbiológico: el impacto ha sido principalmente en la disminución de la carga de trabajo, pues solo se procesan hemocultivos que se detectan como positivos durante el monitoreo continuo de los frascos en equipos automatizados, evitando la contaminación cruzada por técnicas de detección invasiva, y las pruebas de identificación se lleva con sistemas miniaturizados los cuales pueden identificar una gran espectro de microorganismos, por lo que es posible procesar grandes volúmenes de muestras.

Impacto epidemiológico: el soporte computacional que poseen estos sistemas permite obtener listados de positividad por paciente, por muestra, por microorganismo y el conocimiento del rendimiento (% de positividad) del instrumento y la contaminación. Estos datos se pueden evaluar por servicio, por

tipo de muestra, diario, semanal, mensual y/o anual, lo que constituye gran aporte en el control de las bacteriemias intrahospitalarias.

Impacto económico: La implementación de sistemas automatizados ha permitido llevar a cabo la rápida identificación de bacterias causantes de las infecciones más comunes no solo las de sangre, lo cual permite un diagnóstico eficaz, esto disminuye los gastos del paciente porque su tratamiento es dirigido al agente etiológico y el tiempo de estancia en el hospital disminuye. El costo en el procesamiento de una muestra también disminuye debido a que el personal requerido para el procesamiento de las muestras es menor, y por otro lado ya no se tienen que realizar siembras a ciego ya que los equipos de monitoreo continuo detectan viales positivos y los falsos positivos son poco frecuentes.

2.3.1 Sistemas automatizados de monitoreo continuo

El desarrollo y la introducción de los sistemas automatizados durante los 90's aceleraron la tendencia de alejarse de los sistemas de cultivo de sangre tradicional el cual utilizan frascos con medio de cultivo líquido (caldo soya tripticasa) inoculado con una muestra de la sangre del paciente (generalmente 8-10 ml en adultos, 1-3mL en niños). El crecimiento de organismos se identifica por un aumento de la turbidez del medio o hemólisis (descomposición de los glóbulos rojos), teniendo varios inconvenientes, en primer lugar al pasar varias horas los glóbulos rojos pueden asentarse en el fondo de la botella antes de se pueda observar turbidez asociado con el crecimiento bacteriano. En segundo lugar, el grado de turbidez varía de un organismo a otro: los coliformes y estafilococos crecen rápidamente y producen cambios evidentes en la turbidez, mientras que

algunos organismos como los estreptococos y muchos organismos fastidiosos, producen turbidez menos obvia y pueden pasarse por alto. Además la incubación se lleva sin agitación a 35° C por 7 días y se hacen resiembras en ciego en agar sangre de carnero, MacConkey y agar chocolate a las 24, 48 y 168 horas, teniendo el riesgo de contaminar los medios. Los equipos automatizados permiten alertar al microbiólogo que un cultivo es positivo sin la necesidad de realizar muestreos a ciegas, en la tabla 1 se ejemplifican los sistemas automatizados de monitoreo continuo de diferentes casas comerciales. En el laboratorio de Microbiología Clínica de INCMNSZ, las muestras de sangre y líquidos corporales son cultivadas en viales con medio líquido e incubadas en el instrumento BACTEC 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md.), el cual será descrito con detalle más adelante, el porcentaje de positividad mensual de estos cultivos es de 9-11%.

Tabla 1.-Equipos automatizados para la detección de hemocultivos positivos

EQUIPO	CASA COMERCIAL	PRINCIPIO DE DETECCIÓN
Bactec 9240	Becton Dickinson diagnostic instrument systems, sparks, MD. EE. UU.	Hallazgo de CO ₂ producido por bacterias y detectado por fluorescencia en fase sólida.
VITAL	BioMeriux, Marcy-Etoile, Francia	Tecnología de fluorescencia homogénea para medición de pH y variaciones del potencial de óxido-reducción
BacT/Alert	Organon Teknika Corp, Durham, N. C. EE. UU.	El CO ₂ producido por el crecimiento microbiano, por medio de una reacción, hace cambiar el fondo de la botella de verde a amarillo, lo cual se detecta por un sensor colorimétrico.
ESP	Difco Laboratories, Detroit, MI. EE. UU.	Detección de consumo de oxígeno y producción de gases (N ₂ , H ₂ y CO ₂) mediante el monitoreo de las variaciones de presión.
BioArgos	Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-laCoquette, Francia.	Detección de la producción del CO ₂ por espectroscopia infraroja a través de una botella de vidrio.
O.A.S.I.S.	Unipath Ltd., Basingstoke, Reino Unido.	Medición de los cambios de presión en la parte superior de las botellas, monitorizando la posición de un septum de sellado flexible. Este equipo puede detectar tanto la absorción como la producción de gas por medio de un sensor láser.

El sistema BACTEC 9240 es un instrumento que funciona al mismo tiempo como incubadora, agitador y detector de fluorescencia y puede llevar a cabo el monitoreo de 240 botellas de cultivo a la vez. Los frascos están dispuestos en seis bastidores, cada uno tiene 40 estaciones. Cada estación contiene un diodo emisor de luz y un detector de fotodiodo con excitación apropiada y filtros de emisión. Los bastidores están a una temperatura de $35^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, y el equipo hace pruebas de todos los bastidores cada 10 minutos.

Un sensor de CO_2 está unido a la base de cada frasco de cultivo de sangre y está recubierto con 40 ml de un caldo de caseína de soya suplementado. El sensor es impermeable a los iones, a los componentes del medio y a la sangre; pero es libremente permeable al CO_2 . El dióxido de carbono producido por los microorganismos que crecen en el medio se difunde en el sensor y se disuelve en el agua presente en la matriz de sensores, generando iones hidrógeno. Los aumentos en la concentración de iones de hidrógeno (disminución en el pH) aumentan la salida de fluorescencia del sensor, cambiando la señal transmitida a los componentes ópticos y electrónicos del instrumento. El ordenador genera las curvas de crecimiento basado en parcelas de unidades de fluorescencia versus tiempo, y los datos se analizan automáticamente de acuerdo con los algoritmos de detección de crecimiento³². Los cultivos positivos se identifican inmediatamente por una luz indicadora en la parte delantera del instrumento, así como por las luces en cada estación del frasco y se muestran en el monitor de la computadora (Figura 1)



Figura 1. Detección de un cultivo positivo mediante el sistema BACTEC 9240

En el INNCMN, una vez que el sistema alerta al microbiólogo de un cultivo positivo, se retiran los frascos de interés para realizar una tinción de Gram. Si no se visualizan microorganismos, se realiza un subcultivo a ciegas y se retorna el frasco al sistema para que continúe su incubación. Numerosos estudios han demostrado que se necesitan incubar los frascos sólo durante 5 días cuando se utilizan los sistemas de monitoreo continuo, sin embargo en el Instituto se llevan diferentes protocolos de acuerdo al tipo de microorganismo que se espera aislar, en el caso de los hemocultivos se reporta como negativo con 7 días de incubación en organismos no fastidiosos y de rápido crecimiento.

2.3.2 Sistemas automatizados para la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias.

La aplicación de los instrumentos automatizados para aislamiento, identificación y determinación de susceptibilidad antimicrobiana desarrollados para su aplicación clínica internacional en los laboratorios de microbiología y/o de patología clínica suelen mostrar diferencias en su desempeño en las diferentes regiones del mundo o incluso pueden observarse diferencias entre instituciones ubicadas en la misma

región geográfica. Todo ello debido a las diversas condiciones subyacentes de los pacientes, así como a las diferencias epidemiológicas de los organismos prevalentes en dichas instituciones, además de las diferencias ecológicas notables inducidas por el intenso uso de antibióticos en los hospitales modernos.

El personal de los laboratorios de microbiología clínica debe estar consciente de la posibilidad de variabilidad en la exactitud de los sistemas automatizados de identificación y susceptibilidad dependiente de la versión de la base de datos que en ese momento ofrece el fabricante y de la disponibilidad de las recomendaciones pertinentes para lograr la identidad plena del microorganismo y la susceptibilidad correcta a los antibióticos probados. Por otro lado, existe la posibilidad de que las bases de datos, con la información taxonómica de los microorganismos así como de los diferentes mecanismos de resistencia de importancia clínica, se tornen obsoletas en corto o mediano plazo si no se cuenta con la revisión técnica frecuente o bien con un proceso de actualización permanente, por ello se debe estipular claramente cuáles son los procedimientos o acciones correctivas de un laboratorio cuando se obtenga un resultado inusual por el perfil bioquímico extraño o infrecuente que presente un aislado clínico o bien por el perfil de susceptibilidad antimicrobiana inesperado. De esta manera, las observaciones de los programas expertos instalados en los instrumentos automáticos recomiendan adicionar un grupo de pruebas complementarias para definir el perfil de identificación confiable o en caso contrario, el aislado deberá enviarse a un laboratorio de referencia para su análisis. Estos eventos suelen ocurrir a pesar de contar con un programa de control de calidad estricto en el

laboratorio, dado que para la determinación de las pruebas de susceptibilidad e identificación suelen emplearse organismos estándar y estables.

La determinación de la identidad correcta de los microorganismos y de la susceptibilidad antimicrobiana de forma rápida en los aislados de infecciones graves, tales como bacteriemia, es relevante para el diagnóstico acertado y para mejorar el desenlace del paciente durante su tratamiento. El sistema BACTEC 9240 detecta eficientemente cultivos positivos; sin embargo las resiembras subsecuentes necesarias para el desarrollo bacteriano en placa, para la identificación y para la susceptibilidad por los métodos convencionales, consumen mucho tiempo. Por ello, se ha informado que si se realizan la identificación y pruebas de susceptibilidad directamente del cultivo positivo en el frasco (método directo) se pueden obtener los resultados en el mismo día.

Los métodos convencionales utilizados para la identificación, se remontan a más de 100 años, en ellos se utilizaban grandes volúmenes de medio (10mL o más) para comprobar alguna característica en particular de un solo microorganismo, por lo que inocular un cultivo de prueba en tubos individuales era muy complicado. A través de los años muchos microbiólogos han ideado realizar pruebas bioquímicas en tubos con volúmenes de medio más pequeño. Hartman y cols., desarrollaron sistemáticamente diferentes métodos miniaturizados para reducir el volumen de los reactivos y medios.

Los sistemas miniaturizados surgen a partir del concepto de la placa microtituladora (96 pozos), que permite reducir el volumen de sustratos y número de pruebas en los ensayos, así como estudiar en un formato manejable el efecto de un compuesto sobre un gran número de aislados o el de una serie de

compuestos sobre un aislado determinado^{17,18}. Esta línea de investigación ha permitido desarrollar algunos de los medios de cultivo selectivos que se encuentran en el mercado actualmente, por ejemplo el medio azul de anilina, para *Candida albicans* que fue desarrollado y comercializado por DIFCO.

Entre los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en actualidad, basados en el metabolismo de sustratos específicos por parte de los microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores, que pueden discriminar especies de un solo género, por ejemplo; las tarjetas O.B.I.S., que son pruebas colorimétricas para la discriminación de *Listeria monocytogenes* de otras especies, por la determinación de D-alanilaminopeptidasa, o contener una galería completa para la identificación de más de 800 especies de bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras (bioMérieux API[®]), tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia (BBL Enterotube y Oxi/FermTube, BD); y soportes plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidratan en contacto con la muestra (BBL Crystal, BD; RapIDsystems y MicroID, Remel; Biochemical ID systems, Microgen). Uno de los sistemas miniaturizados y automatizados más conocidos y sofisticados es el sistema Vitek (bioMérieux) que se basa en cambios de color de los sustratos y en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de una tarjeta plástica que contienen los sustratos.

Los primeros estudios comparativos centrados en torno a la evaluación de estos kits para muestras clínicas comparando los equipos de diagnóstico y la selección

de sistemas miniatura fueron hechas por Cox y Fung en 1984 y 1989 respectivamente, llegando a la conclusión de que los sistemas miniaturizados son más exactos, y eficientes en cuanto ahorro de mano de obra en comparación con los métodos convencionales.

Todas las mejoras han sido posibles gracias al avance tecnológico, dando grandes beneficios a los laboratorios no solo de microbiología sino también de inmunología, química clínica, serología, etc., ya que el diseño y la construcción de los sistemas automatizados van desde un dispensador de líquido en las placas de microtitulación, hasta instrumentos con lectores automatizados de turbidez, color y fluorescencia, que mediante modelos matemáticos y análisis informáticos interpretan resultados.

2.4 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Desde el inicio de la microbiología clínica hasta la década de 1960 las pruebas que se realizaban para la identificación de un microorganismo consistieron en la observación de sus características morfológicas tales como, la morfología microscópica, colonial, color, olor, pruebas bioquímicas que se realizaban en tubos, pruebas de aglutinación y pruebas de susceptibilidad por difusión en disco. Estos métodos se llaman convencionales y se convirtieron en los métodos de referencia para los sistemas miniaturizados. El siguiente paso en la evolución de los métodos de identificación consistió en miniaturizar las reacciones bioquímicas con sustratos que permitieran patrones de reacciones tanto positivas como negativas para crear un perfil metabólico que pudiera ser comparado con un perfil de base de datos establecida.

Los perfiles bioquímicos están determinados por las reacciones de los microorganismos individuales con cada uno de los sustratos en el sistema. La precisión de las reacciones depende del seguimiento de las instrucciones del fabricante con respecto a la preparación del inóculo, condiciones de incubación, y la interpretación de la prueba. La mayoría de los sistemas de identificación dependen de uno o una combinación de varios indicadores, que incluyen:

- Cambios de pH por la utilización del sustrato
- Reacciones enzimáticas que permitan la liberación de un compuesto fluorogénico o cromogénico
- Indicador de la actividad metabólica
- Detección de ácidos volátiles y no volátiles
- Observación de crecimiento visible

2.5 MÉTODOS PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

Una de las principales funciones del laboratorio de microbiología es determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos en bacterias, y el principal objetivo es determinar si el organismo que causa la infección es susceptible o resistente. Susceptible significa que hay una alta probabilidad que el paciente responda al tratamiento con el régimen de dosis apropiado, resistente significa que la población bacteriana crece en presencia del antibiótico. Un objetivo adicional es guiar al médico para seleccionar el antibiótico más apropiado para un caso en particular.

Actualmente, las pruebas de susceptibilidad están bien estandarizadas para las bacterias aerobias y anaerobias facultativas comunes y para ciertos agentes, con la ayuda de los manuales de la CLSI en donde están escritos los procedimientos

internacionales para estandarizar las pruebas y la forma de realizar la interpretación⁹.

También existen diversos métodos para realizar las pruebas de susceptibilidad como el método de difusión en agar, la prueba E y el método de microdilución en caldo. En los últimos años los métodos automatizados utilizan la microdilución para la determinación de la susceptibilidad. La ventaja de la microdilución es la obtención de un resultado cuantitativo (CMI). La CMI es definida como la concentración más baja a la cual el crecimiento bacteriano es inhibido, en 18 o 24 horas de incubación.

2.6 EQUIPOS AUTOMATIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

En los últimos años, los laboratorios de microbiología clínica han hecho énfasis en la rápida identificación y la determinación de los patrones de susceptibilidad de bacterias aisladas en los hemocultivos con la finalidad de orientar al médico en el tratamiento del paciente. Entre los sistemas más utilizados para la identificación y de sensibilidad están VITEK, SENSITITRE, Micro Scan Walk Away System, ALADIN AND AUTOREADER, Phoenix System, entre otros, los cuales varían con respecto al grado de automatización en la preparación del inóculo y de la siembra, los métodos utilizados para detectar el crecimiento y el algoritmo usado para interpretar y asignar los valores de la CMI y los resultados de las categorías (sensible, intermedia, resistente).

El sistema Vitek tiene sus orígenes en los años 60's, cuando McDonnell Douglas fue contratado por la Administración Nacional de Aeronáutica y Espacio, para desarrollar un sistema automatizado para la detección e identificación de

patógenos directamente de la orina de astronautas en el espacio. Este sistema fue subsecuentemente modificado e introducido para el laboratorio de microbiología clínica en 1976, y se basa en el crecimiento bacteriano en micropozos de tarjetas delgadas de plástico que requiere de cultivos puros para su inoculación, el inóculo se introduce en forma automática a través de un tubo de llenado en una tarjeta miniaturizada de plástico de 64 pocillos, cerrada, que contiene determinadas concentraciones de antibióticos.

Las tarjetas se incuban en un compartimento con temperatura controlada, se efectúan lecturas ópticas cada 15 minutos para medir la cantidad de luz transmitida a través de cada pocillo, incluido un pocillo de control de crecimiento. El análisis algorítmico de la cinética de crecimiento en cada pocillo se realiza con el programa Advanced Expert System (AES), el cual asigna una categoría de interpretación y reporta los patrones de resistencia a los antimicrobianos del microorganismo.

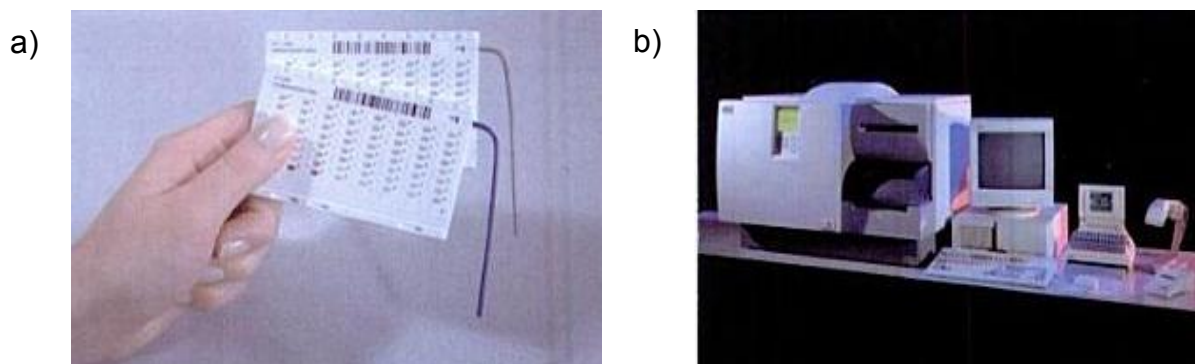


Figura 2.- a) Tarjetas de ID y AST utilizadas en sistema Vitek2, b) componentes del sistema Vitek2.

Los componentes del Vitek2 son la caja protectora del instrumento, el dispositivo de procesamiento de la muestra y la lectora/incubadora, el ordenador, que proporciona el análisis y el almacenamiento de los datos, la Smart Carrier Station, que es la interfase directa entre el microbiólogo y el instrumento, y un escáner de código de barras para facilitar el ingreso de los datos^{16, 40}.

El sistema Vitek2 fue introducido al mercado en 1999, y su habilidad para la identificación y determinación de susceptibilidad tanto para cocos gram positivos como para bacilos gram negativos ha sido evaluado en diferentes reportes. Sin embargo pocos estudios han evaluado la exactitud de identificación y la confiabilidad de los resultados de susceptibilidad con la tarjetas del sistema Vitek inoculadas directamente de un frasco de hemocultivo positivo detectado por el sistema de monitoreo continuo BACTEC 9240, el presente estudio se basa en la combinación de estos 2 sistemas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La bacteriemia es una de las complicaciones más graves en los pacientes hospitalizados, la rapidez del resultado de la identificación y susceptibilidad del germen aislado en el hemocultivo es esencial en el manejo clínico, ya que esta información proveerá al clínico de las herramientas para dar la terapia oportuna al paciente.

4. JUSTIFICACIÓN

Para el diagnóstico de la bacteriemia existen sistemas automatizados que permiten observar el crecimiento de los microorganismos de forma rápida, además se pueden generar otras herramientas que permitan realizar la identificación y susceptibilidad de la bacteria causante de la bacteriemia, mediante el uso de un método directo de inoculación en tarjetas de identificación permitiendo un ahorro de 24 horas para la obtención del resultado final.

5. HIPOTESIS

El método directo produce resultados tan confiables pero más rápidos que el método convencional en la identificación y susceptibilidad de bacterias en frascos de hemocultivo positivos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

- Determinar si el método directo es tan confiable y más rápido que el método convencional en la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias gram positivos y gram negativos de cultivos de sangre y líquidos corporales en frascos BACTEC.

6.2 Objetivos específicos:

- Realizar las pruebas de identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias en frascos de hemocultivos positivos por el método directo.
- Realizar la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias en frascos de hemocultivos positivos por el método convencional.
- Comparar los resultados de la identificación y las pruebas de susceptibilidad entre el método directo y el método convencional.
- Comparar los resultados de susceptibilidad categórica obtenidos por el “Sistema Experto”, con base en la concordancia para las categorías sensibles, intermedias y resistentes.
- Determinar el porcentaje de categorías de error (menor, mayor y grave) para los resultados discordantes.

7. MÉTODO

Diseño del estudio: Prospectivo y Observacional

Población de estudio: Todos los aislados gram positivos y gram negativos desarrollados en viales BACTEC con relevancia clínica, durante el período de 1 de mayo al 31 de diciembre de 2013.

Definiciones operacionales:

Método Directo. Identificación y susceptibilidad del microorganismo (cultivo monobacterianos) mediante el sistema Vitek2, inoculando el cultivo directamente de los frascos que fueron detectados como positivos por el sistema BACTEC 9240.

Método Convencional. Realizar la identificación y susceptibilidad del microorganismo mediante el sistema Vitek2 de los cultivos detectados como

positivos por el sistema BACTEC 9240 a partir del subcultivo de los frascos en placas de agar.

Sistema Experto. Programa de cómputo avanzado que interpreta y corrige los resultados de susceptibilidad obtenidos según el microorganismo identificado.

Error Menor. Resultado verdaderamente intermedio, pero dado como susceptible o resistente.

Error Mayor. Resultado verdaderamente susceptible, pero dado como resistente.

Error Grave. Resultado verdaderamente resistente, pero dado como susceptible.

4. Metodología

a) Proceso del cultivo de sangre y fluidos corporales positivos.

Una vez que el instrumento BACTEC 9240 (Becton Dickinson, MA, USA) detectó un vial positivo, en condiciones estériles, se puncionó con jeringa y se obtuvo una alícuota de 10mL del cultivo.

Método Convencional

De la alícuota de 10mL del cultivo, se inoculó una gota en agar sangre (As), en agar MacConkey (Mc) y en agar chocolate (ACH), los agares se incubaron a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas y se realizó un frotis para tinción de Gram para determinar la morfología microscópica. Después de la incubación, se observó el desarrollo bacteriano en las placas de agar. A partir del cultivo puro se colectaron de 2-3 colonias en solución salina hasta ajustar la concentración 0.5 de McFarland y se inocularon las tarjetas de identificación y susceptibilidad GNI, AST-N115 y GPI, AST-P591 del sistema Vitek 2 (Biomérieux) para microorganismos gram negativos y gram positivos, respectivamente. Las tarjetas se incubaron en el

Sistema Vitek2 y el equipo realizó la interpretación de identificación y susceptibilidad con el sistema experto.

Método Directo

Después de observar el Gram y determinar si el cultivo era monomicrobiano, la alícuota remanente (9.0mL) se vació en dos tubos Vacutainer con gel (cada uno 4.5mL) y se centrifugó a 3,500 rpm por 10' para obtener el concentrado de células bacterianas en el caso de cultivo de sangre, en los cultivos de líquidos corporales se centrifugó a 2300 rpm por 15'. (Ver Algoritmo 1)

El concentrado bacteriano obtenido, se ajustó a la concentración 0.5 de McFarland con solución salina estéril, se inocularon las tarjetas de identificación GNI y GPI y de susceptibilidad, AST-N115 y, AST-P591 del Sistema Vitek2, dependiendo del resultado del Gram. Las tarjetas se incubaron en el Sistema Vitek2 (Biomérieux) y el equipo realizó la interpretación de identificación y susceptibilidad con el sistema experto.

La tarjeta AST-N115 para organismos gram negativos incluye los siguientes antibióticos: ampicilina, amoxicilina/ác. clavulánico, ticarcilina/ác. clavulánico, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, imipenem, meropenem, amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, norfloxacino, tigeciclina, fosfomicina, nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoxazol y piperacilina/tazobactam.

La tarjeta AST-P591 para organismos gram positivos incluye los siguientes antibióticos: ampicilina, benzilpenicilina, cefazolina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, linezolid, moxifloxacino, nitrofurantoína, oxacilina,

quinuspristina/dalfopristina, rifampicina, estreptomicina de alto nivel, teicoplanina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y vancomicina.

Los resultados de susceptibilidad se analizaron utilizando el sistema experto del sistema automatizado.

c) Análisis de Resultados

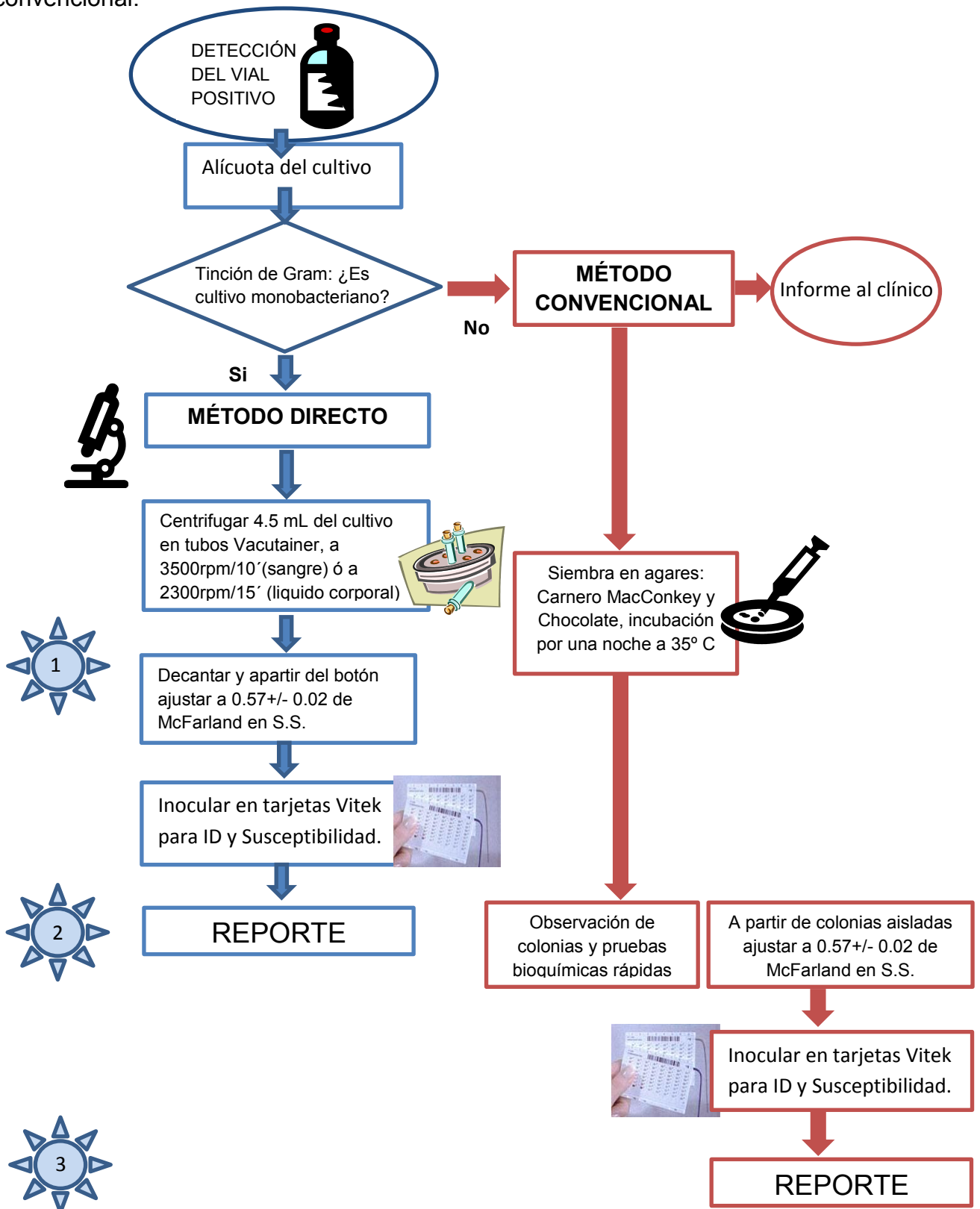
Comparación entre los métodos directo y convencional.

- Los resultados de identificación y susceptibilidad obtenidos del método directo y por el método convencional, se analizaron en base de datos para obtener la reproducibilidad.

Análisis estadístico.

Las pruebas para obtener las estadísticas descriptivas: frecuencias, concordancia, reproducibilidad y kappa se realizaron en el programa SPSS Versión 12.

ALGORITMO 1. Metodología para la identificación y susceptibilidad de cultivos de sangre y líquidos corporales positivos por el método directo y método convencional.



8. RESULTADOS

Durante el período de estudio hubo 241 cultivos positivos de muestras de sangre y líquidos corporales detectados por el sistema automatizado Bactec 9240, de los cuales se descartaron 36 (15%); 21/36 (58%) fueron eliminados por tratarse de cultivos mixtos y 15/36 (42%) se eliminaron de acuerdo a los criterios que hay internamente en laboratorio de microbiología del INCMN por considerarlos contaminantes en base a la clínica del paciente, el cual menciona excluir aquellos cultivos en los que se observan cocos gram positivos agrupados en racimos con el tiempo de positividad mayor o igual a 48 horas y que además no exista antecedentes de otros cultivos (por ejemplo de punta de catéter).

Finalmente se analizaron 205 cultivos monobacterianos tanto por el método convencional como por el método directo, llevando a cabo pruebas de identificación y susceptibilidad con el sistema Vitek 2. El 80% de estos cultivos fueron de sangre, 8% de líquido de ascitis, 3% de líquido peritoneal y 9% de otros líquidos corporales Tabla 1.

En la figura 1, Tabla 2 se observa que el grupo de bacterias que se aisló con mayor frecuencia fueron bacilos gram negativos fermentadores (42%), seguido de la familia *Micrococcaceae* (24%) de ellos 12 (6%) fueron *S. aureus* (SAU) y 37(18%) estafilococo coagulasa negativa (SCN), y bacterias gram negativas no fermentadoras(15%).

Análisis de la identificación de bacterias gram negativas

Se analizaron en total 131(63.9) bacilos gram negativos, de los cuales 102 (77.86) fueron bacterias gram negativas fermentadoras (BGNF) y 29 (22.13) fueron no fermentadoras (BGNNF). De los 131 aislados, 126 (96.1%) fueron identificados

por ambos métodos, obteniendo una kappa global de identificación de 0.946.

Tabla 3

En la Tabla 4 se describe la Identificación de bacterias gram negativas. Se recuperaron 102 BGNF, 101 (49.26%) fueron Enterobacterias, y 1 *Vibrio cholerae*.

En el caso de las enterobacterias solo se obtuvieron 2 (1.9%) discrepancias de los 101 cultivos analizados entre el método directo y el método convencional. Con el método directo el sistema Vitek 2 identificó uno de los cultivos como *Raoultella ornithinolytica* y otro como organismo no identificando, cuando se realizó la identificación de las colonias por el método convencional el sistema Vitek2 identificó los dos organismos como *Enterobacter aerogenes*, obteniéndose una Kappa de 0.98.

Se identificaron 29 (14.14%) BGNF, 26 (89.65%) de ellos fueron identificados correctamente por ambos métodos, obteniendo una kappa de 0.90, los tres cultivos (10.34%) restantes fueron discordantes y se identificaron como *Delfia acidovorans*, *Sphingomonas paucomobilis* y *Cupriavidus pauculus*, cuando se realizó la identificación de las colonias por el método convencional fueron identificadas como *Comamonas testosteroni*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Achromobacter denitrificans* respectivamente.

Análisis de la identificación de bacterias gram positivas

En total se identificaron 74 (36.09%) cultivos positivos con bacterias gram positivas, de ellas 49 (66.2%) fueron identificadas de la familia *Staphylococcaceae*, 9 (12.16%) de la familia *Streptococaceae*, 12 (16.21%) fueron *Enterococcus* spp. y 4 (5.4%) bacilos gram positivos. La kappa global de identificación para gram positivos fue de 0.59. Tabla 5

En la familia *Staphylococcaceae* se identificaron 12 *S. aureus* y 29 *S. epidermidis* por el método convencional, 7 *S. aureus* fueron identificados por el método directo como *Staphylococcus intermedius*, obteniéndose un 58.3% de resultados discrepantes, la kappa de identificación para *S. aureus* fue 0.41. De los 29 *S. epidermidis*, identificados por el método directo, seis (20.6%) fueron *Kocuria kristinae* y uno (3.4%) *S. intermedius*, los 22 (75.8%) restantes fueron identificados como *S. epidermidis*, obteniéndose una Kappa de 0.49. En la familia *Streptococcaceae* 5/9 (55.5%) cultivos fue identificado por ambos métodos obteniendo una kappa de identificación para este grupo de 0.82. En el caso de los *Enterococcus* spp. 7/12 (58.3%) fueron identificados por ambos métodos obteniendo una kappa de 0.33. Tabla 6.

Análisis de las pruebas de susceptibilidad

Se realizó la susceptibilidad de los 205 aislados clínicos obtenidos durante el período de estudio; sin embargo la comparación de la pruebas de susceptibilidad a los diferentes antibióticos sólo se realizó en aquellos cultivos que concordaron en la identificación entre ambos métodos. En la tabla 7 se observa la concordancia global de susceptibilidad por variable categórica y por concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada grupo bacteriano. Se evaluaron 18 antibióticos para BGNF, 17 para BGNNF, 16 para *S. aureus*, 16 para SCN, 15 para *Enterococcus* spp. y 12 para *Streptococcus* spp.

Bacterias gram negativas fermentadoras

En la Tabla 8 se observa la concordancia de la susceptibilidad categórica entre el método directo y el método convencional para cada uno de los antibióticos que contiene la tarjeta AST-N115, la kappa obtenida para bacilos gram negativos

fermentadores para cada uno de los antibióticos fue de 0.81 a 1, el antibiótico en donde se encontró mayor discrepancia fue la nitrofurantoína, con 8 (8.4%) pruebas de susceptibilidad discordantes; sin embargo fue uno de los antibióticos sin errores mayores. En total se realizaron 1699 pruebas de susceptibilidad por ambos métodos obteniendo una kappa global de 0.94.

Los antibióticos en los cuales se obtuvieron errores mayores fueron: amoxicilina/ác.clavulánico, ticarcilina/ác. clavulánico, cefazolina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima y gentamicina.

En la tabla 9 se describe el intervalo de las concentraciones mínimas inhibitorias para cada uno de los antibióticos en las que se distribuyeron las cepas analizadas, la proporción de concordancia ± 1 dilución de la CMI de ambos métodos, y estadístico kappa de la susceptibilidad esencial para los 18 antibióticos probados, se puede observar que la CMI determinada por el sistema Vitek2 fue la misma en los 95 cultivos analizados para los antibióticos ertapenem, imipenem, y meropenem tanto por el método directo como por el método convencional, dando un porcentaje de concordancia del 100 por ciento y una kappa de 1. La kappa para este grupo de bacterias fue de 0.62 a 1, el antibiótico que presentó mayor discrepancia entre el método convencional y el directo al determinar la CMI fue nitrofurantoina con una $\kappa=0.62$.

Bacterias gram negativas no fermentadoras

Para este grupo de bacterias se puede observar que la concordancia de la susceptibilidad categórica entre el método convencional y el método directo por antibiótico fue de 0.85 a 1; la fosfomicina fue el antibiótico con menor concordancia. La kappa global obtenida fue de 0.97 ya que solo 4 pruebas de 326

no concordaron entre el método convencional y el método directo, es importante resaltar que para este grupo de bacterias no se encontraron errores graves. Tabla 10

En el análisis de la susceptibilidad esencial se encontró que el intervalo de las CMI para este grupo de bacterias es más amplio en algunos antibióticos, por ejemplo imipenem y meropenem, por otro lado la proporción de concordancia ± 1 dilución más baja fue del 94% mientras que la kappa varía desde 0.7 a 1 (Tabla 11). Los antibióticos con mayor concordancia en la CIM entre ambos métodos fueron: ampicilina, amoxicilina, ticarcilina y cefazolina que mostraron una $\kappa=1$, y el antibiótico con menor concordancia entre ambos métodos fue meropenem $\kappa=0.71$.

Staphylococcus aureus

En la tabla 12 se observa que la concordancia para la susceptibilidad categórica para esta especie es excelente puesto que la kappa obtenida para todos los antibióticos analizados es igual a 1, es decir todas las pruebas de susceptibilidad concordaron entre ambos métodos. Se llevó a cabo el análisis solo de las seis cepas que tuvieron concordancia en la identificación.

Para este grupo de bacterias se evaluaron 16 antibióticos en 9 de ellos se observó una sola CMI determinada por el sistema Vitek2 tanto por el método convencional como por el método directo para los 6 aislados probados, todos los antibacterianos analizados tuvieron una proporción de concordancia ± 1 dilución del 100%, pero la kappa para la CMI varió de 0.4 a 1, los antibióticos con mayor discordancia fueron ciprofloxacino, linezolid, vancomicina y nitrofurantoína, Tabla 13

Estafilococcus coagulasa negativa

En la tabla 14 se observa que para este grupo de bacterias hubo errores en la mayoría de los antibióticos, siendo graves para clindamicina (12%), trimetoprim/sulfametoxazol (12%), eritromicina (8%), y tetraciclina (4%), por otro lado la kappa para susceptibilidad categórica fue de 0.56 a 1, siendo teicoplanina la que tuvo menor concordancia entre ambos métodos.

Se analizaron 25/37 aislados clínicos de SCN para la susceptibilidad por CMI, ya que los otros 12 no fueron concordantes en la identificación. La proporción de concordancia ± 1 dilución fue desde el 84%. Los antibióticos con mayor discrepancia fueron cefazolina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, y trimetoprim/sulfametoxazol, con una kappa de 0.42, 0.25, 0.24, 0.34 y 0.38 respectivamente. Los antibióticos oxacilina, moxifloxacino, nitrofurantoína y quinupristina/dalfopristina tuvieron los mismos resultados de la CIM por ambos métodos. Tabla 15

Enterococcus spp

En la tabla 16 se describe la concordancia en la determinación de susceptibilidad categórica que hay entre ambos métodos para este grupo de bacterias, los antibióticos en los que hubo discordancia fueron teicoplanina y nitrofurantoína, el primero con un error grave del 14.3% y el segundo con el 28.6% de error menor. La kappa global fue de 0.95 y la kappa por antibiótico fue de 0.54 a 1.

Se determinó la CMI en 7 aislados clínicos de enterococcus identificados por ambos métodos, la proporción de concordancia ± 1 dilución más baja fue de 85.7% para trimetoprim/sulfametoxazol. En 7 antibióticos (ampicilina, estreptomicina de nivel alto, gentamicina, ciprofloxacino, eritromicina, clindamicina y linezolid) la CMI

fue la misma por ambos métodos dando una $\kappa=1$, y el antibiótico con mayor discordancia fue bencilpenicilina con una Kappa de 0.38. Tabla 17

9. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como objetivo determinar si el método directo es tan confiable y más rápido que el método convencional en la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias gram positivos y gram negativos de cultivos de sangre y líquidos corporales en frascos BACTEC. Los resultados mostraron que el objetivo se cumplió en la identificación y pruebas de susceptibilidad para bacterias gram negativas pero no para gram positivas.

La rápida identificación de bacterias y determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos, por medio del método directo es crucial en pacientes con bacteriemia ya que el índice de morbi-mortalidad disminuiría si se dan tratamientos más dirigidos. De igual manera, no menos importantes son las infecciones de los líquidos corporales por lo que deben atenderse con la misma importancia, en este trabajo se incluyeron muestras de LCR, líquido de ascitis, líquido articular, líquido peritoneal e, incluso un cultivo de células tallo (ya que se requiere del análisis microbiológico para asegurar la calidad de paquetes de trasfusión) que al igual que la sangre se cultivan en frascos BACTEC.

De inicio, para llevar a cabo el método directo es importante observar un frotis del cultivo teñido por Gram, si se observa más de una morfología en el frotis no es posible llevar a cabo este método ya que el equipo tiene baja discriminación en cultivos mixtos y, por lo tanto es necesario esperar a obtener colonias aisladas en las placas de agar.

La observación del frotis teñido por Gram define si el cultivo se trabaja por el método convencional o por el método directo; sin embargo, es importante no dejar de hacer la resiembra en medios de cultivo sólido, porque a pesar de que el frotis

revele solo una morfología se puede tratar de cultivos mixtos. Estudios previos han reportado que del 6% al 10% de los cultivos, que aparentemente son monomicrobianos al observar la tinción de Gram, en los subcultivos aparecen colonias con más de una morfología^{12, 35, 45}. En este estudio el 8.7% de los cultivos que se consideraron en primera instancia monobacterianos por la observación del frotis, fueron descartados del estudio porque los cultivos en agar revelaron que en realidad eran cultivos mixtos.

Un ejemplo de cultivo mixto que se procesó por el método directo porque a nivel de tinción no fue posible reconocer que había más de una bacteria fue el de un cultivo que tenía *E. coli* lactosa positivo y *E. coli* lactosa negativo esto se observó en el agar MacConckey.

La tinción jugó un papel muy importante para discriminar entre grupos bacterianos y poder elegir la tarjeta a utilizar, en este estudio se invalidaron tres cultivos por el uso incorrecto de tarjeta, los casos que se dieron fueron: *Haemophilus influenzae* que se identifica con la tarjeta NH pero se utilizó incorrectamente una tarjeta para gram negativos (GNI) y para identificar *Listeria monocytogenes* se debe utilizar la tarjeta ANC y se utilizó la tarjeta para gram positivos (GPI).

Las bacterias más frecuentemente encontradas durante el período de estudio fueron gram negativas. Hace poco más de 10 años se reportó *E. coli* como el principal causante de bacteriemia en el INCMN Salvador Zubirán atribuyendo esto al tipo de enfermedades tratadas en el instituto (enfermedades renales que lleva a infecciones urinarias, infecciones de cirugías abdominales o infecciones por enfermedades hepáticas), en este estudio nuevamente encontramos a *E. coli*

como el primer agente causante de bacteriemia, seguido de *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*².

En el caso de bacterias gram positivas se encontró a *S. epidermidis* y *S. aureus* como los protagonistas en los cultivos analizados; sin embargo la identificación de estas bacterias por el sistema Vitek2 realizando el método directo no es buena, dado que *S. epidermidis* fue reportado en 6 casos como *Kocuria kristinae* y un caso como *S. intermedius*, y más de la mitad de *S. aureus* fue identificada como *S. intermedius*, es posible que la falta de discriminación entre las especies se deba a que las características fenotípicas entre estos microorganismos son muy similares y además algunos microorganismos presentan variabilidad en la utilización de azúcares, por ejemplo *S. intermedius* puede o no utilizar los azúcares maltosa, lactosa y manitol.

Es importante mencionar que con el objeto de ahorrar material se descartaron todos aquellos cultivos en los que la morfología macroscópica apuntaba a que se trataba de *Staphylococcus epidermidis*, y que además por aportación de los clínicos se decidía que no era necesario llevar a cabo la ID y las pruebas de susceptibilidad, aun cuando ya se había obtenido el resultado por el método directo. También se descartaron aquellos cultivos en los que se observó la tinción de cocos pequeños gram positivos en racimos y que por técnicas de biología molecular se detectó el gen *nuc* que identifica a la bacteria a nivel solo de género.

La recuperación de bacterias como *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium striatum*, *Propionibacterium acnés*, *Corynebacterium jeikeium*, está fuertemente asociado a una contaminación del cultivo con flora normal de la piel, generalmente por malas técnicas en la toma de muestra; sin embargo se tomaron en cuenta

para el análisis porque se puede dar el caso de que se trate de bacteremias verdaderas. Para los médicos uno de los parámetros para la evaluación de hemocultivos es si el cultivo se trata de un cultivo "verdaderamente positivo" o es un "falso positivo" (pseudobacteriemia), lo cual se determina con la patogenicidad del microorganismo, el patrón de crecimiento, y el grado en el que el resultado "encaja" con los otros hallazgos clínicos. Weinstein y cols., analizaron una serie de aislados estimando el índice de contaminación y la frecuencia de contaminación y determinaron que las bacterias gram-positivas tenían más probabilidad de ser contaminantes como SCN (94%), especies de *Bacillus* sp. (94%) y especies de *Corynebacterium* sp.(79%), *Streptococcus viridans* (48%) y de *S. aureus* (25%); sin embargo el aislamiento de estos dos últimos microorganismos es preocupante ya que el cultivo de estas bacterias en sangre sin fuente obvia siempre plantea la posibilidad de una endocarditis.

Es claro que la identificación correcta por el método directo debe ser exacta ya que de esto depende el tratamiento de los pacientes, algunos autores que han evaluado los sistemas automatizados para la identificación de microorganismos causantes de bacteriemias mediante la inoculación directa a las tarjetas de identificación y pruebas de susceptibilidad de los frascos de hemocultivo, muestran resultados similares a los encontrados en este trabajo. De Cueto y cols., analizaron 100 cultivos llevando a cabo el método directo y el método convencional, tanto para identificación como para determinar la susceptibilidad bacteriana utilizando el sistema Vitek2 y este autor obtuvo el 62% de concordancia en la identificación, 28% no fueron identificados y 10% fueron mal identificados, analizaron 50 cultivos de bacterias gram positivas de los cuales ninguno mostró

concordancia entre ambos métodos, 13 aislados fueron no identificados, y 37 fueron mal identificados, en el caso de las bacterias gram negativas 31(62%) fueron identificadas correctamente por el método convencional, 14(28%) fueron no identificados y 5(10%) fueron mal identificadas¹². En otro estudio evaluaron el sistema Vitek2 para el método directo solo para bacterias gram negativas, analizaron 118 cultivos y encontraron que el 82.2% fueron correctamente identificados, 17.8% no fueron identificados, este autor sugiere que la mala identificación cuando se realiza el método directo se debe a que las trazas de la sangre como células y fibras pueden haber afectado las reacciones bioquímicas en el proceso de identificación y propone llevar a cabo lavados del botón de bacterias para mejorar los índices de identificación. Por otra parte también menciona que el metabolismo lento de bacterias no entéricas puede generar una reacción bioquímica más débil por lo que no se pueden identificar de forma directa²⁰.

Otros autores se han enfocado en realizar la identificación por el método directo sólo para bacterias gram negativas ya que se ha observado que para bacterias gram positivas no da buenos resultados como en este estudio^{6, 30}. Los resultados de Blanco y cols., también se parecen a los del presente estudio ya que la concordancia entre el método directo y el convencional para la identificación de bacterias gram negativos no fermentadores fue de 92.3% y para las enterobacterias 86%, en este trabajo se encontró una concordancia de 89.6% para BGNNF y 98% para BGNF con una kappa de 0.90 y 0.98 respectivamente.

Se confirma que la identificación de bacterias gram positivas por los sistemas automatizados utilizando el método directo no es buena. En nuestro estudio se

obtuvo una kappa de 0.59 de identificación para bacterias gram positivas mientras que para bacterias gram negativa se obtuvo una kappa de 0.94.

Para las pruebas de susceptibilidad a las antibacterianos uno de los factores que se debe controlar y que es clave al realizar este tipo de estudios es la concentración de bacterias, en este caso el inóculo se ajustó a lecturas lo más cercano a 0.5 de MacFarland (0.57 ± 0.02) tanto por el método directo como por el método convencional, algunas limitantes que tiene el método directo es que los restos celulares que quedan con la masa bacteriana después de la centrifugación interfieren al ajustar la densidad bacteriana, de hecho no se puede trabajar con cultivos de frascos de cultivo BACTEC™ Myco/F Lytic, ya que este tipo de frascos contienen en su formulación saponina que actúa como agente hematólítico y que al centrifugar todos los restos celulares quedan sobre el gel separador junto con la masa bacteriana. Por otra parte aquellos frotis en los que se observaron pocas bacterias por campo fue necesario centrifugar una alícuota más del cultivo para asegurar obtener el inóculo a 0.5 de MacFarland.

Para determinar que se puede llevar a cabo el método directo y agilizar los resultados sin afectar la exactitud de las pruebas de susceptibilidad, los resultados se compararon con los resultados obtenidos en el método convencional pero sólo de los cultivos que concordaron en la identificación a nivel de especie, ya que aunque la CMI generada por el sistema Vitek2 no depende de la identificación, la susceptibilidad categórica cambia de acuerdo al género y especie de la bacteria.

La literatura reporta que los sistemas automatizados para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, el porcentaje de error global en pruebas categóricas deben ser menor al 10%, incluyendo errores graves menores a 1.5%,

y errores mayores menores al 3%^{6, 26, 44}. Al llevar cabo el método directo esto se cumplió sólo en bacterias gram negativas, ya que para BGNF el porcentaje de error global que incluye errores graves y mayores fue de 9.1%, y para BGNNF fue del 5.2%; en el caso de bacterias gram positivas el porcentaje de error global permisible se rebasa en SCN y *Enterococcus*, además en más de un antibiótico hay errores mayores al 1.5%, lo cual indica que el sistema Vitek 2 puede reportar una cepa como sensible a determinado antibiótico siendo que es resistente, y esto pondría en riesgo al paciente.

Existen guías internacionales para evaluar la exactitud de un equipo automatizado de pruebas de susceptibilidad. La ISO 20776-2 indica que el porcentaje de concordancia para pruebas de susceptibilidad esencial ± 1 dilución y la concordancia para pruebas categóricas debe ser mayor igual a 90%, los errores graves y mayores deben ser menor igual a 3%, y la reproducibilidad ± 1 dilución debe ser mayor del 95%. En la guías para la industria, la FDA propone que la concordancia para pruebas de susceptibilidad esencial y la concordancia para pruebas categóricas debe ser mayor igual al 89.9%, los errores graves deben ser menor igual a 1.5%, los errores mayores deben ser menor igual a 3% y los índices de fracaso de crecimiento deben ser menores de 10%, esto en comparación con métodos estándares^{20, 23, 26}.

La determinación de la CMI tiene la finalidad de informar el grado de efectividad que tendrá el fármaco sobre la bacteria causante de cierta infección, y a pesar de que esto se traduce en susceptible, resistente o intermedio es importante conocer la CMI para observar los cambios de susceptibilidad de las bacterias a los diferentes antimicrobianos y de esta forma conocer el perfil de resistencia y dar

tratamientos empíricos más seguros y eficaces; sin embargo en un estudio realizado en hospitales de tercer nivel en la Ciudad de México sobre vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana se reportó que solo un laboratorio registraba el 100% de sus datos de susceptibilidad esencial y mantenía actualizado al cuerpo médico sobre el perfil de resistencia¹.

En este trabajo se analizó la concordancia entre el métodos directo y el método convencional al determinar la susceptibilidad esencial, y se observó que la concordancia en pruebas de susceptibilidad esencial ± 1 dilución fue mayor al 93% y kappa fue mayor a 0.6, para bacterias gram negativas con lo cual el sistema Vitek2 cumple con lo establecido por la FDA y la ISO 20776-2^{20, 23}. Para bacterias gram positivas se obtuvo una concordancia del 84%, con kappa de hasta 0.2 que de acuerdo con la categorización de Landis y Coch la concordancia es baja^{29, 38}.

En el presente trabajo se observó que *S. aureus* presentó la misma CMI para varios antibióticos en los 6 cultivos analizados, este resultado nos indica la posibilidad de que la infección por estas bacterias se haya adquirido, probablemente, en el mismo entorno.

Los resultados de susceptibilidad para gram negativos obtenidos en este trabajo son similares a obtenidos por otros autores, Marjan J y cols., encontraron concordancia del 99.2% en la susceptibilidad esencial para bacterias gram negativas, con 0.8% de error grave y 0.02 de error mayor. Thomas KW y cols., evaluaron 11 antibióticos para gram positivos, de los cuales el imipenem fue el antibiótico con menor concordancia.

Por otro lado De Cueto y cols., evaluaron 10 antibióticos para cada grupo bacteriano y reportan un porcentaje de error global de 6.6% para gram negativos,

la distribución fue 2.4% de errores graves, 0.6% de errores mayores, y 3.6% de errores menores^{6, 12, 30}. Para las bacterias gram positivas encontraron un error global de 8.4% para todos los antibióticos probados distribuidos en 3.2% de errores graves, 2.4 de errores mayores y 2.8% de errores menores. En nuestro estudio encontramos que para bacterias gram negativas el porcentaje de error grave es aceptable para BGNF dado que fueron igual al 1%, y para BGNNF solo un antibiótico presentó un porcentaje de error mayor igual al 5.2%, y el porcentaje de error global fue de 10.1% para bacterias gram negativas fermentadoras y de 5.2% para bacterias gram negativas no fermentadoras, mientras que para bacterias gram positivas el porcentaje de error fue de hasta el 12.5% en algunos antibióticos específicos. Si comparamos la kappa obtenida para susceptibilidad categórica con la Kappa obtenida para la CMI se puede observar que es mayor la categórica, esto es porque hay más de una dilución de diferencia dentro de los puntos de corte que definen las categorías sensible, resistente, o intermedio y por lo tanto, aunque la CMI sea diferente, la susceptibilidad categórica puede llegar a ser la misma.

El de-escalamiento de antibióticos es un mecanismo mediante el cual se logra la provisión de un tratamiento inicial eficaz, evitando el uso innecesario de antibióticos que promuevan el desarrollo de resistencia. Se trata de un elemento clave en los programas de la administración de antimicrobianos y paradigmas de tratamiento para la sepsis grave³⁶. En este estudio se observó que la determinación del antibiograma es preciso cuando se lleva a cabo el análisis por el método directo, obtener el resultado 24hrs antes que el método convencional es una estrategia para mejorar el tratamiento del paciente ya que la realización de

desescalada es que en base a los resultados del laboratorio de microbiología el tratamiento empírico inicial se interrumpa, o se reduzca en espectro o se cambie.

10. CONCLUSIONES

1. La concordancia de identificación y susceptibilidad antimicrobiana entre el Método Directo y el Método Convencional para *Enterobacteriaceae* y BGN No Fermentadores fue excelente, por lo que se recomienda el uso del Método Directo para dar resultados rápidos y confiables.
2. El método directo reduce el tiempo de información de resultados confiables de 72 a 24 horas.
3. La reducción del tiempo de los resultados tiene gran impacto en el tratamiento oportuno del paciente, lo que conlleva a menor estancia hospitalaria, disminuir el riesgo de adquirir infecciones intrahospitalarias y la disminución de costos.
4. No es recomendable el uso del método directo para realizar la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias gram positivas debido a la baja concordancia entre el método directo y el convencional.
5. Actualmente, el método directo es utilizado en el laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ para la identificación y pruebas de susceptibilidad de bacterias gram negativas de hemocultivos.

11. ANEXO

TABLA 1. Tipo de muestras procesadas por ambos métodos

TIPO DE MUESTRA	NÚMERO DE CULTIVOS	PORCENTAJE
Sangre	164	80.0
Ascitis	17	8.3
Líquido de diálisis peritoneal	8	3.9
LCR (líquido ceforraquídeo)	5	2.4
Mielocultivo	4	2.0
Líquido pleural	3	1.5
Líquido articular	3	1.5
PRE CRIO (Células tallo)	1	0.5
Total	205	100

TABLA 2. Agentes causales de infección encontradas en el cultivo de muestras procesadas en un periodo de 6 meses

GRUPO BACTERIANO	No. DE CULTIVOS (%)
BGNF(bacilos gram negativos fermentadores)	101 (49.26)
BGNNF (bacilos gram negativos no fermentadores)	30 (14.63)
<i>Staphylococcus spp.</i>	49 (23.9)
<i>Enterococcus spp.</i>	12 (5.8)
<i>Streptococcaceae</i>	9 (4.3)
BGP (bacilos gram positivos)	4 (1.9)
Total	205(100%)

FIGURA 1.- Distribución por grupo bacteriano

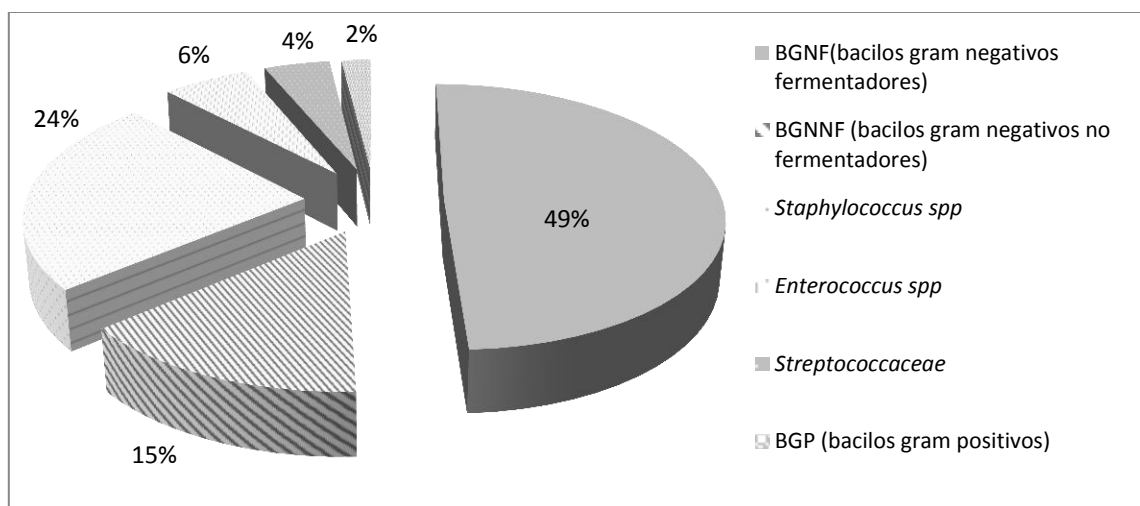


Tabla 3.- Concordancia entre el método directo y el método convencional para identificación de bacterias gram negativas.

BACILOS GRAM NEGATIVOS	IDENTIFICACION POR AMBOS METODOS (%)	Kappa
FERMENTADORES	100/102 (98.0%)	0.98
NO FERMENTADORES	26/29 (89.6%)	0.90
Concordancia Global	126/131 (96.1%)	0.94

Tabla 4.- Resultados de identificación por método directo y método convencional de bacterias gram negativas, aisladas en frascos BACTEC.

		ESPECIE	IDENTIFICADOS CORRECTAMENTE	DISCORDANTES	TOTAL
BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES	ENTEROBACTERIAS	<i>Salmonella</i> subsp.	4	0	4
		<i>Morganella morganiis sp morgannii</i>	1	0	1
		<i>Escherichia coli</i>	68	0	68
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1(<i>Raoultella ornithinolytica</i>) 1(No identificado)	3
		<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	13	0	13
		<i>Enterobacter cloacae complex</i>	4	0	4
		<i>Salmonella entérica ssp enterica</i>	1	0	1
		<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	1
		<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1
		<i>Serratia marcescens</i>	1	0	1
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	2
	<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	1	
TOTAL			100 (98.03%)	2 (1.9%)	102(100%)
BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES		<i>Comamonas testosteroni</i>	0	1(<i>Delftia acidovorans</i>)	1
		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0	1
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	1(<i>Sphingomonas paucimobilis</i>)	4
		<i>Acinetobacter ursingii</i>	1	0	1
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	0	16
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0	1
		<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	1	0	1
		<i>Achromobacter denitrificans</i>	1	1(<i>Cupriavidus pauculus</i>)	2
		<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	0	1
		<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1	0	1
TOTAL			26 (89.6%)	3 (33.3%)	29(100%)

Tabla 5.- Concordancia entre el método directo y el método convencional para la identificación de bacterias gram positivas.

GRUPO BACTERIANO	IDENTIFICACION POR AMBOS METODOS (%)	Kappa
* <i>Staphylococcus</i> spp coagulasa negativa	26/37 (70)	0.49
* <i>Staphylococcus aureus</i>	5/12 (4)	0.41
<i>Enterococcus</i> spp	7/12 (58)	0.33
<i>Streptococcaceae</i>	5/9 (55)	0.82
Bacilos gram positivos	4/4 (100)	1.00
Concordancia global	48/74 (64.86)	0.59

TABLA 6.- Resultados de identificación por método directo y método convencional de bacterias gram positivas, aisladas en frascos BACTEC.

	ESPECIE	BIEN IDENTIFICADOS	DISCORDANTES	TOTAL
SCN	Organismo no identificado	1	0	1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22	6(<i>Kocuria kristinae</i>) 1(<i>Staphylococcus intermedius</i>)	29
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1(<i>Kocuriakristinae/Alloiococcus otitis</i>) 1(<i>Staphylococcus warneri</i>)	4
	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp <i>hominis</i>	1	1(<i>Kocuria kristinae</i>)	2
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0	1
	TOTAL	27 (72.9%)	17 (27.1%)	37 (100%)
SAU	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	7(<i>Staphylococcus intermedius</i>)	12
	TOTAL	5 (41.66%)	7 (58.3%)	12 (100%)
STREPTOCOCCACEAE	<i>Streptococcus gallolyticus</i> ssp <i>gallolyticus</i>	0	1(<i>Streptococcus mutans</i>)	1
	<i>Streptococcus pluranimalium</i>	0	1(<i>Gemella morbillorum</i>)	1
	<i>Streptococcus mitis/</i> <i>Streptococcus oralis</i>	0	1 (<i>Granulicatella adiacens</i>)	1
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	1(<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	1
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	0	3
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	1
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1	0	1
	TOTAL	5 (55.5%)	4 (44.5)	9 (100%)
Enterococcus spp	<i>Enterococcus faecium</i>	5	3(<i>Enterococcus gallinarum</i>) 1(<i>Enterococcus hirae</i>) 1(Organismo no identificado)	10
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0	2
	TOTAL	7(58.3%)	5 (41.6%)	12 (100%)
BGP	<i>Corynebacterium striatum</i>	2	0	2
	<i>Propionibacterium acnes</i>	1	0	1
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	0	1
	TOTAL	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)

Tabla 7.- Concordancia global de la susceptibilidad para Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y susceptibilidad categórica, entre el método directo y el método convencional.

GRUPO BACTERIANO	NUMERO DE CULTIVOS	NUMERO DE ENSAYOS	Kappa de CMI	Kappa de SUSCEPTIBILIDAD CATEGORICA
BGNF	95	1699	0.93	0.94
BGNNF	19	326	0.90	0.97
SCN	25	400	0.58	0.91
<i>S. aureus</i>	6	96	0.90	1.00
<i>Enterococcus spp</i>	7	105	0.88	0.95
<i>Streptococcus spp</i>	1	12	1.00	1.00

Tabla 8.- Concordancia de la Susceptibilidad Categórica entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para BGNF.

ANTIBIÓTICO	AMBOS MÉTODOS			n _T	% ERROR			κ
	n (%)				GRAVE	MAYOR	MENOR	
	S	R	I					
AM	20(100)	64 (95.3)	4 (75)	88	0	0	4.5	0.89
AMC	56 (96.4)	17 (94.1)	22 (81.8)	95	1.0	0	6.3	0.86
TCC	62 (100)	23(82.6)	10 (70)	95	1.0	0	6.3	0.85
CZ	51 (98.0)	42 (95.2)	2 (0)	95	1.0	0	4.2	0.89
CAZ	67 (100)	27 (96.2)	1 (100)	95	1.0	0	0	0.97
CRO	67 (100)	28 (96.4)	-----	95	1.0	0	0	0.97
FEP	68 (100)	27 (96.2)	-----	95	1.0	0	0	0.97
ETP	94 (100)	-----	-----	94	0	0	0	1.00
IPM	92 (100)	-----	-----	92	0	0	0	1.00
MEM	95 (100)	-----	-----	95	0	0	0	1.00
AN	90 (100)	5 (100)	-----	95	0	0	0	1.00
GM	70 (100)	25 (96)	-----	95	1.0	0	0	0.97
CIP	60 (100)	34 (100)	1 (100)	95	0	0	0	1.00
NOR	61 (100)	31 (100)	3 (100)	95	0	0	0	1.00
TGC	92 (100)	1 (100)	2 (100)	95	0	0	0	1.00
FOS	88 (98.8)	7 (100)	-----	95	0	1.0	0	0.93
FT	69 (95.6)	8 (87.5)	18 (77.7)	95	0	0	8.4	0.81
SXT	56 (96.4)	39 (100)	-----	95	0	2.1	0	0.96

κ=0.94 N=1699

AM(ampicilina), AMC(amoxicilina/ác. clavulánico), TCC(ticarcilina/ác. clavulánico), CZ(cefazolina), CAZ(ceftazidima), CRO(ceftriaxona), FEP(cefepima), IMP(imipenem), MEM(meropenem), AN(amicacina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), NOR(norfloxacino), TGC(tigeciclina), FOS(fosfomicina), FT(nitrofurantoína), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol) TZP(piperacilina/tazobactam).

Tabla 9.- Concordancia de la Concentración Inhibitoria Mínima entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para BGNF.

ANTIBIÓTICO	INTERVALO DE CIM	AMBOS MÉTODOS ±1 dilución, n(%)	Kappa ¹
AM	≤2 a ≥32	88/88(100)	0.89
AMC	≤2 a ≥32	89/95(93)	0.84
TCC	≤8 a ≥128	94/95(98)	0.79
CZ	≤4 a ≥64	92/95(96)	0.86
CAZ	≤1 a ≥64	90/95(94)	0.82
CRO	≤2 a ≥64	94/95(98)	0.90
FEP	≤1 a ≥64	93/95(98)	0.90
ETP	≤0.5	94/94(100)	1.00
IMP	≤1	92/92(100)	1.00
MEM	≤0.25	95/95(100)	1.00
AN	≤2 a 16	94/95(98)	0.70
GM	≤1 a ≥16	94/95(98)	0.93
CIP	≤0.25 a ≥4	95/95(100)	0.94
NOR	≤0.5 a ≥16	95/95(100)	0.96
TGC	≤0.5 a ≥8	95/95(100)	0.82
FOS	≤16 a ≥256	95/95(100)	0.76
FT	≤16 a 256	95/95(100)	0.62
SXT	≤20 y ≥320	93/95(97)	0.95

AM(ampicilina), AMC(amoxicilina/ác. clavulánico), TCC(ticarcilina/ác. clavulánico), CZ(cefazolina), CAZ(ceftazidima), CRO (ceftriaxona), FEP(cefepima), ETP(ertapenem), IMP(imipenem), MEM(meropenem), AN(amicacina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), NOR(norfloxacino), TGC(tigeciclina), FOS(fosfomicina), FT(nitrofurantoina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

¹Cálculo de la concordancia sobre el valor absoluto de la CIM

Tabla 10.-Concordancia de la Susceptibilidad Categórica entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para BGNNF.

ANTIBIÓTICO	AMBOS MÉTODOS			n _T	% ERROR			κ
	n(%)				GRAVE	MAYOR	MENOR	
	S	R	I					
AM	2 (100)	15(100)	2(100)	19	0	0	0	1.00
AMC	4 (100)	15(100)	-----	19	0	0	0	1.00
TCC	6 (100)	13(100)	-----	19	0	0	0	1.00
CZ	1 (100)	18(100)	-----	19	0	0	0	1.00
CAZ	8 (100)	9 (100)	2(100)	19	0	0	0	1.00
CRO	2 (100)	15(100)	2(100)	19	0	0	0	1.00
FEP	9 (100)	10(100)	-----	19	0	0	0	1.00
IPM	11(100)	7 (100)	1 (0)	19	0	0	5.2	0.89
MEM	12(100)	6 (100)	1 (0)	19	0	0	5.2	0.89
AN	8 (100)	9 (100)	1 (0)	18	0	0	5.5	0.89
GM	9 (100)	10(100)	-----	19	0	0	0	1.00
CIP	9 (100)	9 (100)	1(100)	19	0	0	0	1.00
NOR	9(100)	9 (100)	1(100)	19	0	0	0	1.00
TGC	5 (100)	14(100)	-----	19	0	0	0	1.00
FOS	5 (80)	14(100)	-----	19	0	5.2	0	0.85
FT	17(100)	1(100)	1(100)	19	0	0	0	1.00
SXT	3 (100)	15(100)	-----	18	0	0	0	1.00

κ= 0.97 N=326

AM(ampicilina), AMC(amoxicilina/ác. clavulánico), TCC(ticarcilina/ác. clavulánico), CZ(cefazolina), CAZ(ceftazidima), CRO (ceftriaxona), FEP(cefepima), ETP(ertapenem), IMP(imipenem), MEM(meropenem), AN(amicacina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), NOR(norfloxacino), TGC(tigeciclina), FOS(fosfomicina), FT(nitrofurantoína), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

Tabla 11.-Concordancia de la Concentración Inhibitoria Mínima entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para BGNNF.

ANTIBIÓTICO	INTERVALO DE CIM	AMBOS MÉTODOS ±1dilución, n(%)	Kappa ¹
AM	≤2 a ≥32	19/19(100)	1.00
AMC	≤2 a ≥32	19/19(100)	1.00
TCC	≤8 a ≥128	19/19(100)	1.00
CZ	≤4 a ≥64	19/19(100)	1.00
CAZ	≤1 a ≥64	19/19(100)	0.77
CRO	≤1a ≥64	19/19(100)	0.85
FEP	≤1a ≥64	18/19(94)	0.85
IMP	≤1a ≥16	18/19(94)	0.85
MEM	≤0.25 a ≥16	18/19(94)	0.71
AN	≤2 a ≥64	17/18(94)	0.81
GM	≤1 a ≥16	19/19(100)	0.81
CIP	≤0.25 a ≥4	19/19(100)	0.84
NOR	≤0.5 a ≥16	19/19(100)	0.79
TGC	≤0.5 a ≥8	19/19(100)	0.75
FOS	≤16 a ≥256	19/19(100)	0.74
FT	≤16 a ≥256	19/19 (100)	0.85
SXT	≤20 y ≥320	17/18(94)	0.77

AM(ampicilina), AMC(amoxicilina/ác. clavulánico), TCC(ticarcilina/ác. clavulánico), CZ(cefazolina), CAZ(ceftazidima), CRO (ceftriaxona), FEP(cefepima), ETP(ertapenem), IMP(imipenem), MEM(meropenem), AN(amicacina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), NOR(norfloxacino), TGC(tigeciclina), FOS(fosfomicina), FT(nitrofurantoína), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

¹Cálculo de la concordancia sobre el valor absoluto de la CIM

Tabla 12.- Concordancia de la Susceptibilidad Categórica entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para *S.aureus*.

ANTIBIÓTICO	AMBOS MÉTODOS			n _T	% ERROR			κ
	S	R	I		GRAVE	MAYOR	MENOR	
P	-----	6(100)	-----	6	0	0	0	1.00
OX1	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
CZ	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
GM	5 (100)	1 (100)	-----	6	0	0	0	1.00
CIP	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
MXF	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
E	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
CC	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
QDA	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
LNZ	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
TEC	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
VA	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
TE	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
NT	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
RA	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00
SXT	6 (100)	-----	-----	6	0	0	0	1.00

κ=1.00 N=96

P(benzilpenicilina), OX1(oxacilina), CZ(cefazolina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina), QDA(quinuspristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoina), RA(rifampicina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

Tabla 13.-Concordancia de la Concentración Inhibitoria Mínima entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para *S.aureus*.

ANTIBIÓTICO	INTERVALO DE CIM	AMBOS MÉTODOS ±1dilución, n(%)	Kappa ¹
P	≥0.5	6/6 (100)	1.00
OX1	≤0.25 y 0.5	6/6 (100)	1.00
CZ	≤4	6/6 (100)	1.00
GM	≤0.5 y ≥16	6/6 (100)	1.00
CIP	≤0.5 a 1	6/6 (100)	0.57
MXF	≤0.25	6/6 (100)	1.00
E	≤0.25	6/6 (100)	1.00
CC	≤0.25	6/6 (100)	1.00
QDA	≤0.25 y 0.5	6/6 (100)	1.00
LNZ	1 y 2	6/6 (100)	0.40
TEC	≤0.5	6/6 (100)	1.00
VA	≤0.5 a 1	6/6 (100)	0.40
TE	≤1	6/6 (100)	1.00
NT	≤16 a 32	6/6 (100)	0.67
RA	≤0.5	6/6 (100)	1.00
SXT	≤10	6/6 (100)	1.00

P(benzilpenicilina), OX1(oxacilina), CZ(cefazolina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina), QDA(quinupristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoina), RA(rifampicina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

¹Cálculo de la concordancia sobre el valor absoluto de la CIM

Tabla 14.-Concordancia de la Susceptibilidad Categórica entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para SCN (*Staphylococcus* spp. coagulasa negativa).

ANTIBIÓTICO	AMBOS MÉTODOS			n _T	% ERROR			K
	n (%)				GRAVE	MAYOR	MENOR	
	S	R	I					
P	1 (100)	24 (100)	-----	25	0	0	0	1.00
OX1	3 (66.6)	22 (100)	-----	25	0	4	0	0.77
CZ	3 (66.6)	22 (100)	-----	25	0	4	0	0.77
GM	15 (100)	9 (90)	-----	25	0	0	4	0.91
CIP	12 (100)	11 (100)	1 (50)	25	0	0	4	0.92
MXF	19 (100)	6 (100)	-----	25	0	0	0	1.00
E	6 (100)	17 (89.4)	-----	25	8	0	0	0.80
CC	4 (100)	21 (80.9)	-----	25	12	0	4	0.58
QDA	25 (100)	-----	-----	25	0	0	0	1.00
LNZ	25 (100)	-----	-----	25	0	0	0	1.00
TEC	23 (95.6)	-----	1 (100)	25	0	0	8	0.56
VA	25 (100)	-----	-----	25	0	0	0	1.00
TE	21 (100)	3 (75)	-----	25	4	0	0	0.83
NT	25 (100)	-----	-----	25	0	0	0	1.00
RA	22 (100)	3 (100)	-----	25	0	0	0	1.00
SXT	13 (92.3)	12 (75)	-----	25	12	4	0	0.67

κ=0.91 N=400

P(benzilpenicilina), OX1(oxacilina), CZ(cefazolina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina), QDA(quinupristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoina), RA(rifampicina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

Tabla 15.-Concordancia de la Concentración Inhibitoria Mínima entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para SCN.

ANTIBIÓTICO	INTERVALO DE CIM	AMBOS MÉTODOS ±1dilución, n(%)	Kappa ¹
P	0.25 a ≥0.5	25/25(100)	0.65
OX1	≤0.25 y ≥4	25/25(100)	1.00
CZ	≤4 a ≥64	21/25(84)	0.42
GM	≤0.5 a ≥16	25/25(100)	0.88
CIP	≤0.5 a ≥8	25/25(100)	0.86
MXF	≤0.25a ≥8	25/25(100)	1.00
E	≤0.25 a ≥8	23/25(100)	0.80
CC	≤0.25 a ≥8	23/25(100)	0.85
QDA	≤0.25 y 0.5	25/25(100)	1.00
LNZ	≤0.5 a 2	25/25(100)	0.26
TEC	≤0.5 a ≥32	21/25(84)	0.24
VA	≤0.5 a 4	24/25(96)	0.34
TE	≤1 a ≥16	25/25(100)	0.79
NT	≤16 y 32	25/25(100)	0.78
RA	≤0.5 a ≥32	25/25(100)	1.00
SXT	≤10 a 160	24/25(96)	0.38

P(benzilpenicilina), OX1(oxacilina), CZ(cefazolina), GM(gentamicina), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina), QDA(quinuspristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoina), RA(rifampicina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

¹Cálculo de la concordancia sobre el valor absoluto de la CIM

Tabla 16.-Concordancia de la Susceptibilidad Categórica entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para *Enterococcus* spp.

ANTIBIÓTICO	AMBOS MÉTODOS			n _T	% ERROR			K
	n (%)				GRAVE	MAYOR	MENOR	
	S	R	I					
P	3 (100)	4 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
AM	3(100)	4 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
GM	4 (100)	3 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
HLS	4 (100)	3 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
CIP	3 (100)	4 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
MXF	3 (100)	4(100)	-----	7	0	0	0	1.00
E	1 (100)	5 (100)	1 (100)	7	0	0	0	1.00
CC	-----	7 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
QDA	4 (100)	2 (100)	1 (100)	7	0	0	0	1.00
LNZ	7 (100)	-----	-----	7	0	0	0	1.00
TEC	4 (100)	2(66.6)	-----	7	14.3	0	0	0.69
VA	4 (100)	3 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
TE	4 (100)	3 (100)	-----	7	0	0	0	1.00
NT	3 (100)	1 (50)	1 (50)	7	0	0	28.6	0.54
SXT	-----	7(100)	-----	7	0	0	0	1.00

$\kappa=0.95$ N=105

P(benzilpenicilina), AM(ampicilina), GM(gentamicina de alta sinergia), HLS(estreptomicina de alta sinergia), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina),QDA(quinuspristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoina), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

Tabla 17.- Resultados de la Concordancia de la Concentración Inhibitoria Mínima entre el Método Directo y el Método Convencional por antibiótico para *Enterococcus* spp.

ANTIBIÓTICO	INTERVALO DE CIM	AMBOS MÉTODOS ±1dilución, n(%)	Kappa ¹
P	1 a ≥64	6/7 (85.7)	0.38
AM	≤2 a ≥32	7/7 (100)	1.00
Gentamicina de nivel alto (sinergia)	SYN-R ó SYN-S	7/7 (100)	1.00
Estreptomicina de nivel alto (sinergia)	SYN-R ó SYN-S	7/7 (100)	1.00
CIP	≤0.5 a ≥8	7/7 (100)	1.00
MXF	≤0.25 a ≥8	7/7 (100)	0.74
E	0.5 a ≥8	7/7 (100)	1.00
CC	≤0.25 a ≥8	7/7 (100)	1.00
QDA	0.5 a 8	7/7 (100)	0.65
LNZ	1 a 2	7/7 (100)	1.00
TEC	≤0.5 a ≥32	6/7 (87.5)	0.74
VA	≤0.5 a ≥32	7/7 (100)	0.80
TE	≤1 a ≥16	7/7 (100)	0.77
NT	≤16 a 128	7/7 (100)	0.58
SXT	≤10 a ≥320	6/7 (85.7)	0.79

P(benzilpenicilina), AM(ampicilina), GM(gentamicina), HLS(estreptomicina de concentración alta), CIP(ciprofloxacino), MXF(moxifloxacino), E(eritromicina), CC(clindamicina), QDA(quinuspristina/dalfopristina), LNZ(linezolid), TEC(teicoplanina), VA(vancomicina), TE(tetraciclina), NT(nitrofurantoína), SXT(trimetoprima/sulfametoxazol).

¹Cálculo de la concordancia sobre el valor absoluto de la CIM

12. REFERENCIAS

1. Benavides Plascencia Lilia. et. al. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. Salud Pública Méx 2005; Vol. 47(3):219-226
2. Bautista Alavez Anabertha. Tendencia de la resistencia de microorganismos causales de bacteriemia en un hospital de enseñanza. Tesis de licenciatura. México, D. F. INCMN Salvador Zubirán. 2001
3. Blanco María Alejandra, et. al. Identificación y sensibilidad de bacilos gram-negativos. Evaluación del uso de un sistema automatizado directamente de los frascos de hemocultivo. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2008; 42(1):5-10.
4. Bourbeau Paul, et. al. Use of the BacT/Alert Blood Culture System for Culture of Sterile Body Fluids Other than Blood. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36(11): 32373-3277
5. Bouza E, Sousa D, Rodriguez-Creixems M, Lechuz JG Muñoz P. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of blood stream infections? Journal Clinical Microbiology. 2007; 45(1): 2765-2769.
6. Bruins, M. J., et. al., Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive Bactec blood culture bottles into Vitek2. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42(1):7-11.
7. Caroline Rönnerberg, et. al. Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences. Diagnostic Microbiology and Infections Disease.2013; 76 (3): 286-290.
8. Chang-Ping Su, et. al. Predictive model for bacteremia in adult patients with blood cultures performed at the emergency department: A preliminary report. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 2011; 44(1): 449-455.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty fourth Informational Supplement M100-S24, 2014; 34 (1): 1-230.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and procedures for blood culture. Approved guideline. M47-A. 2007; 27(17): 1-13.
11. Cobo Reinoso Javier, et. al. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías Clínicas SEIMC. 2006
12. De Cueto Marina, et. al. Use of Positive Blood Cultures for Direct Identification and Susceptibility Testing with the Vitek2 System. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(8): 3734-3738.
13. Edme Félix Alfred Vulpian (1826-1887). Consultado en Febrero 2014 en <http://www.historiadelamedicina.org/vulpian.htm>

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 2012 consultado en Enero 2014 en <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDF>
15. Ferraro M. J., y J. H. Jorgensen .Susceptibility testing instrumentation an computerized expert systems for data analysis and interpretation. Pp 1593-1600 en P. R. Murray et.al. Manual of clinical microbiology American Society for Microbiology, Washington D. C.
16. Forbes Betty A., et. al. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, 12a. edición, pp. 778-797.
17. Fung Daniel Y. C. Historical development of rapid methods and automation in microbiology. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. 1992; 1:1-14.
18. Fung Daniel Y. C. Rapid methods and automation in microbiology. Comprehensive review in food science and food safety. 2002; 1: 3-22.
19. Gates Robert H. Infections disease secrets. 2nd ed. United States: Elsevier Health Sciences; 2003. pp 111
20. Guidance for Industry and FDA. Antimicrobial Susceptibility Test Systems. Class II Special Controls Guidance Document, 28 Agosto 2009.
21. Hughes John G. Culture with BACTEC Peds Plus/F Bottle Compared with Conventional Methods for Detection of Bacteria in Synovial Fluid. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39(12): 4468-4471.
22. Hsiu-Hsien Lin et. al. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. Journal of Microbiology, Immunology an Infection. 2013; 46(1):48-52.
23. International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems-Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices-Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. ISO 20776-2. 2007.
24. Jaramillo Sergio, Equipos de monitoreo continuo en hemocultivos, Acta Médica Colombiana. 1996; 21(5): 270-275.
25. Jordá Vargas Liliana, et. al. Utilidad del Sistema Vitek en la identificación y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2005; 39(1):19-25
26. Jorgensen J. H. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. Journal of Clinical Microbiology, 1993; 31(11): 2964-2966.
27. Kathie Hopkins MSN, et. al. Reducing blood culture contamination rates: A systematic approach to improving quality of care. American Journal of Infection Control. 2013; 30(1):1-3.
28. Koneman Elmer W. et. al. Diagnóstico microbiológico. 6^{ta} ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008. pp 96-105.

29. Landis J. R. Koch G. C. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1):159-174.
30. Ling Thomas K. W. y Cheng Augustine F. B. Evaluation of the Vitek2 System for Rapid Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 10(47): 4705-4707.
31. Li J. Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *Journal Clinical Microbiology*. 1994; 32(11): 2829-2831.
32. Nolte F. S. et. al. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240).
33. Patrick R. Murray et. al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: ASM PRESS; 2005. pp 1380-1381.
34. Patrick R. Murray et. al. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, D. C.: ASM PRESS; 2007. Vol.1. pp 192-214.
35. Putman L. R., et. al. Accuracy of the Vitek system for antimicrobial susceptibility testing *Enterobacteriaceae* bloodstream infection isolates: use of "direct" inoculation from Bactec 9240 blood culture bottles. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*. 1997; 28(2):101-104.
36. Rello J. et. al. *Infectious Diseases in Critical Care*. 2da ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2007. Pp 164-165.
37. Rodriguez López F., et. al. Indicaciones y valoración clínica del hemocultivo. *Medicine*. 2002; 8 (61) 3267-3269.
38. Ruiz M. Alvaro y Morillo Z. Luis E. *Epidemiología Clínica. Investigación clínica aplicada*. Bogotá: Medica Panamericana; 2004. pp 295.
39. Stephen G. Jenkins y Robert C. Jerris, *Critical Assessment of Issues Applicable to Development of Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints*. 2011; 9(49):S5-S10.
40. Stager C. E. and Davis J. R. Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Rev*. 1992; 5(3):302-327.
41. Soloaga Rolando N., et. al. Evaluación del antibiograma directo desde el frasco de hemocultivo con el sistema Vitek 2C: su utilidad en la clínica. *Revista Argentina de Microbiología* .2012; 44(3):165-169.
42. Trenholme Gordon M. et. al. Clinical Impact of Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacterial Blood Culture Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989; 27(6):1342-1345.
43. Tenney JH, Reller LB, Mirrett S, Wang WL, Weinstein MP, Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. *Journal Clinical Microbiology*. 1982; 15(4):558-561.
44. Versalovic James, et. al. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington, D. C.: ASM PRESS; 2011. Vol. 1. pp. 19-22.

45. Waites, K. B. et. al. Direct bacterial identification from positive BacT/Alert blood cultures by using MicroScan overnight and rapid panel. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*. 1998; 36(7): 2052-2056.
46. Yasuharu Tokuda, et al. The degree of chills for risk of bacteremia in acute febrile illness. *The American Journal of Medicine*. 2005; 118(12):1417e1 - 1417e6.