



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Recuperación de microorganismos en hemocultivos y
líquidos diversos detectados como negativos a partir de lisis y
crecimiento en medios enriquecidos”**

TESIS

**Que para obtener el título de
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

PRESENTA

Emmanuel Nieto Juárez

ASESORAS:

QFB Reyna Flores Cima

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Edo. De México 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Recuperación de microorganismos en hemocultivos y líquidos diversos detectados como negativos a partir de lisis y crecimientos en medios enriquecidos.

Que presenta el pasante: **Emmanuel Nieto Juárez**

Con número de cuenta: 307269483 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Diciembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

DEDICATORIAS

El presente trabajo se lo dedico primeramente a mi madre, tía Maru y hermano, ya que han estado conmigo a lo largo de todo esto, que sin importar las circunstancias ni situaciones no me han dejado solo, me han brindado su total apoyo.

A mi niño hermoso, que a pesar de llegar de forma inesperada ha, es y seguirá siendo ese motor en mi vida para dar siempre lo mejor y más.

A esos seres queridos que se nos han adelantado en el camino, que han dejado marcada su huella en nosotros y que siempre estarán presentes en nuestros recuerdos y corazones.

De igual forma a esas personas que me han acompañado en este proceso en diferentes etapas y momentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la UNAM que me ha brindado tanto por tampoco, en particular a la FESC.

A la sección de microbiología del hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI por permitir la realización de este trabajo.

A la Q.F.B Reyna por la asesoría de dicho trabajo. De igual forma a la M. en C. Ana Laura porque además de asesorarme a lo largo de este trabajo me brindó su apoyo total.

A mis padres en particular a mi madre que sin ella simplemente no hubiera podido llegar a este punto de mi preparación, gracias por todo sabes que te quiero mucho. A mi tía Maru cuyo apoyo ha sido fundamental a lo largo de este camino.

ÍNDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCION	5
1.1 Bacteriemia	5
1.2 Generalidades de Bacterias	6
1.2.1 Gram positivas y Gram negativas	9
1.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.2.5 <i>Escherichia coli</i>	14
1.2.6 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
1.2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.3 Generalidades de Levaduras y Fungemia	17
1.4 Hemocultivo	18
1.5 Principales microorganismos presentes en hemocultivo.....	21
1.6 Sangre y Líquidos diversos	23
1.6.1 Sangre	23
1.6.2 Líquido cefalorraquídeo (LCR).....	24
1.6.3 Líquido sinovial (LS)	25
1.6.4 Líquido pleural (LP).....	26
1.6.5 Líquido peritoneal (LP).....	27
1.7 Sistemas automatizados de detección e identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana	28
1.8 Sistema de detección bacteriana “Thermo Scientific VersaTrek”.....	31
1.9 Sistema de identificación y sensibilidad bacteriana “Vitek 2”	33
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN	39
2.1 Hipótesis	40
2.2 Objetivo General	40
2.3 Objetivos Particulares.....	40
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	44
CAPITULO 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	56
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS.....	56
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS.....	57

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1 Bacteriemia

En nuestro medio suele denominarse septicemia a la invasión persistente del torrente circulatorio por bacterias u hongos que da lugar a manifestaciones clínicas de infección sistémica, como fiebre, taquicardia, leucocitosis y otras. El diagnóstico etiológico de las septicemias se efectúa mediante el cultivo de la sangre o hemocultivo, el aislamiento del microorganismo e identificación, incluso ahora con técnicas de biología molecular. (Prats, 2005).

El término bacteriemia se refiere a la presencia de bacterias en la sangre, la fungemia es por lo tanto la presencia de hongos en la sangre. (Loza, 2003). Como resultado de esta infección generalizada por alguno de estos agentes se produce la sepsis o septicemia. (Rodríguez, 2012).

La septicemia se define como e proceso invasivo persistente del sistema circulatorio, que presenta manifestaciones clínicas inflamatorias sistémicas como fiebre, taquicardia, leucocitosis, entre otras. Se diagnostica normalmente mediante la realización de un hemocultivo, que al arrojar un resultado positivo, confirma la presencia de los microorganismos en circulación. Sin embargo existe un alto índice de hemocultivos que resultan negativos y quizá sea debido a que se requiere de un inóculo grande de 1×10^5 bacterias aproximadamente, o a que la muestra no fue tomada en el momento adecuado. (Rodríguez, 2012).

La entrada al torrente circulatorio de una bacteria o de un hongo se produce a partir de una infección focal, que puede estar localizada en la piel, en el tracto urinario, en el pulmón, en el tubo digestivo o en otro lugar que constituye la puerta de entrada (o foco de sepsis). (Prats, 2005).

Los catéteres y otros instrumentos intravasculares colonizados también son un foco de sepsis frecuente. La bacteriemia o la fungemia se establece cuando la

multiplicación de los microorganismos en la sangre supera la capacidad del sistema fagocitario para eliminarlos (Prats, 2005).

El aislamiento e identificación del microorganismo, ya sea por técnicas bioquímicas o por técnicas de biología molecular sigue siendo considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de dichas infecciones sistémicas.

1.2 Generalidades de Bacterias

Las bacterias se consideran protistas (unicelulares) pertenecientes al reino de los Procariotas, seres caracterizados por no poseer un verdadero núcleo, sino una formación nuclear sin membrana, pero sí tienen pared celular (García, 1997).

Los microorganismos poseen estructuras que les permiten coexistir con otros tipos de microorganismos y también con organismos superiores (Montoya, 2008).

Estructuralmente están constituidos por elementos obligados que están presentes en todas las bacterias y son indispensables para la vida de la propia bacteria, estos son pared celular, membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y la región nuclear y están los elementos facultativos que pueden estar o no presentes en la bacteria, tales como cápsula, flagelos, pelos o fimbrias, endosporas e inclusiones citoplasmáticas (Granados, 2003).

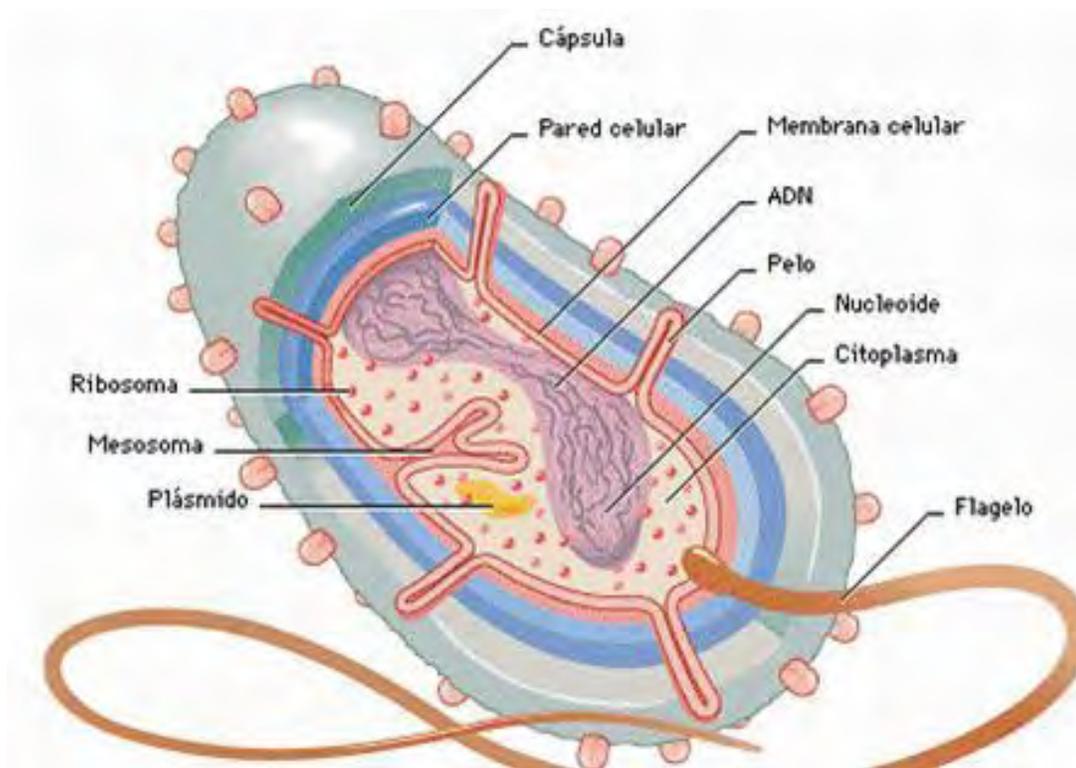


Imagen 1. Estructuras principales de las Bacterias.

Imagen: En Las bacterias, <http://microagentesmelisa.galeon.com/> (Revisado 10/10/2016)

En la morfología bacteriana se encuentran características mayores como: el tamaño, la forma o estructura y el tipo de agrupación. Algunas veces, estas características se relacionan con el género y en ocasiones con una especie determinada. Las bacterias pueden ser esféricas, en forma de bastón o de espiral, y se clasifican en: cocos, bacilos y espirales (Montoya, 2008).

Los cocos son células bacterianas cuya forma habitual es esférica pero, eventualmente, aparecen formas elipsoidales. Cuando aparecen en agrupaciones se organizan en formas diferentes según la especie. Este tipo de ordenamiento obedece a la forma de reproducción, propio de cada especie. (Montoya, 2008).

Según este patrón de ordenamiento los cocos se clasifican así: Diplococos (pares), Estreptococos (cadena), Tétrada (grupos de 4), Estafilococos (racimos) y Sarcinas (cubos). (Montoya, 2008).

Los bacilos son formas bacterianas alargadas que pueden ser cortas, rectas o cilíndricas y a veces son tan cortas y difíciles de identificar que se denominan cocobacilos. La agrupación de los bacilos es diferente a la de los cocos, pues al contrario de éstos, aquellos casi nunca se agrupan. Algunas especies, sin embargo, muestran tendencia a un ordenamiento de sus células, que no obedece a un patrón genético, sino que depende de las etapas de desarrollo o de las condiciones del cultivo. En algunas observaciones pueden aparecer conformando parejas (diplobacilos), cadenas (estreptobacilos) o en grupos irregulares que forman verdaderas empalizadas (Montoya, 2008).

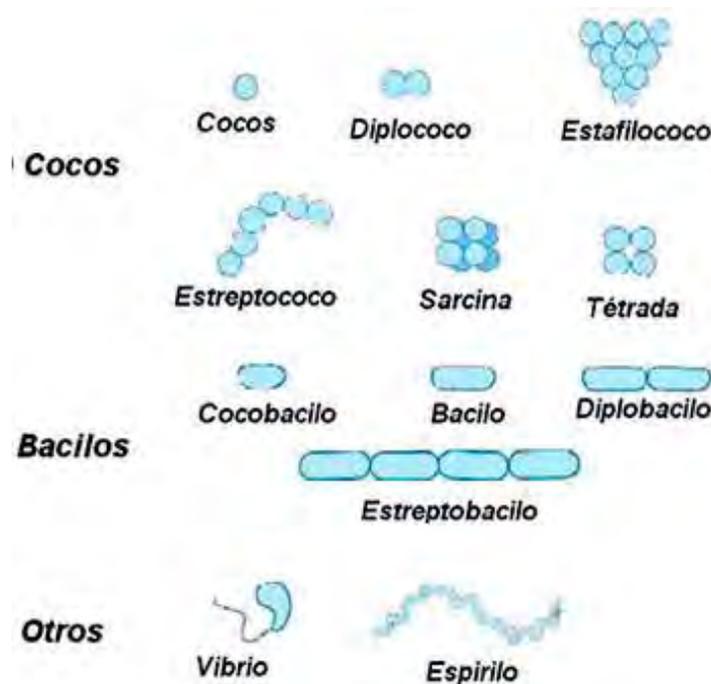


Imagen 2. Principales formas y agrupaciones bacterianas.

Imagen: Mariana Ruiz, en Wikimedia Commons.

1.2.1 Gram positivas y Gram negativas

Las bacterias se han clasificado durante mucho tiempo como bacterias Gram Positivas y Gram Negativas, en función de su comportamiento frente a la tinción de Gram. El hecho de que se comporten como Gram Positivas (se tiñen de color violeta oscuro), o como Gram Negativas (color rosa) se debe a su pared celular.

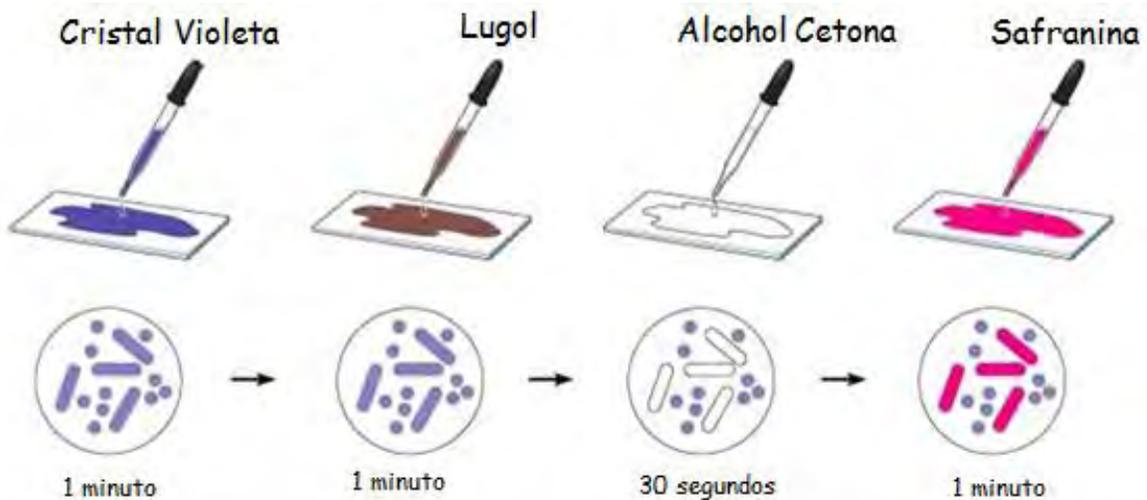


Imagen 3. Tinción de Gram.

Imagen: Bacterias de Interés Clínico,

<https://compendiomicrobiologia.wordpress.com/2014/03/09/staphylococcus-spp/> (Revisado 11/10/2016)

La pared celular de las Gram Positivas es monoestratificada y está compuesta por peptidoglicano, polisacáridos, proteínas y ácidos teicoicos. Baja en lípidos, el peptidoglicano presente formando una monocapa es un componente importante que supone el 50% del peso seco de algunas células bacterianas. La pared celular de las Gram Negativas, es biestratificada; la primera capa está constituida por peptidoglicano, y la segunda capa está formada por: polisacáridos, proteínas, fosfolípidos y lípidos. No hay ácidos teicoicos. El peptidoglicano está en poca cantidad. El peptidoglicano, está compuesta por cadenas de ácido N-acetil murámico (NAM) y ácido N-acetil glucosamina (NAG) unidas entre sí por puentes peptídicos. La pared celular de las Gram Positivas es más rica en peptidoglicano que la de las Gram Negativas (Granados, 2003).

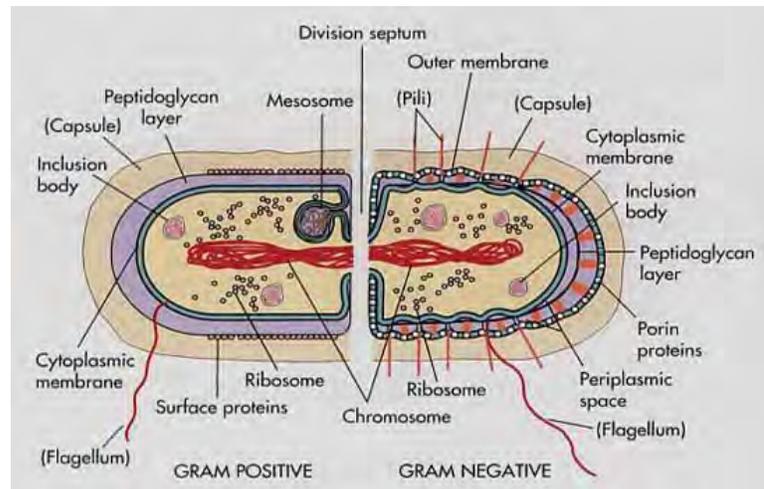


Imagen 4. Diferencias de pared celular entre Gram Positivas y Gram Negativas.

Imagen: Biología médica, <http://biologiamedica.blogspot.mx/2010/09/bacterias-gram-positivas-y-gram.html> (Revisado 11/10/2016)

1.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una bacteria Gram Positiva, es un coco agrupado en racimos, anteriormente era considerado como un microorganismo comensal inocuo en la piel humana, pero hoy en día se considera como un importante patógeno oportunista, pues es la causa más frecuente de las infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes con dispositivos médicos permanentes (Koneman, 2008).

Con respecto a la patogenicidad, *Staphylococcus epidermidis* es capaz de producir macromoléculas de superficie que inician y luego aumentan la adhesión bacteriana a la superficie plástica de cuerpos extraños. La adherencia inicial parece estar mediada por una adhesina polisacárida llamada PS/A y otras proteínas de superficie. La PS/A se trata de un polímero de galactosa-arabinosa de alto peso molecular, después de la adherencia inicial, hay otra fase llamada de adherencia intracelular que es mediada por un polisacárido llamado PIA y una proteína extracelular; esto permite la formación de varias capas de células bacterianas adheridas entre sí que forman el llamado biofilm. (Otto, 2009).

Este biofilm sirve para proteger a los microorganismos de los agentes antimicrobianos y de las células fagocíticas. En general, es necesaria la remoción del cuerpo extraño para lograr la cura de la infección. (Otto, 2009).

Para su identificación se utiliza la tinción de Gram, donde se observan cocos positivos agrupados en racimos, se aíslan en Agar Nutritivo o Sangre donde la morfología colonial es colonias pequeñas blancas, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa; tras realizar las pruebas bioquímicas primarias se tendrá que son Catalasa positiva y Oxidasa negativa, para diferenciar de *Staphylococcus aureus* se realiza la prueba de coagulasa la cual es negativa y la siembra en Agar Sales Manitol la cual es negativa. (Koneman, 2008).

1.2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram Positiva, es un coco agrupado en racimos, forma parte de la microbiota normal de la piel, especialmente de la nariz y el perineo de los seres humanos y los animales, sin embargo se destaca como un importante patógeno humano que produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. (Hurtado, 2002).

Staphylococcus aureus posee un arsenal de elementos que justifican su capacidad patogénica y de defensa ante los mecanismos de defensa del hospedador y los antimicrobianos utilizados para su combate, en el siguiente cuadro se muestran los determinantes de patogenicidad en *Staphylococcus aureus*. (Hurtado, 2002).

Cuadro 1. Determinantes de patogenicidad de *Staphylococcus aureus*.

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidoglicano ▪ Ácidos teicoicos ▪ Proteína A ▪ Cápsula mucoide 	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
Enzimas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulasa ▪ Estafiloquinasas ▪ Hialuronidasa ▪ Lipasas 	Formación de absceso Destrucción del coagulo Invasión hística Colonización
Toxinas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas ▪ Leucocidina ▪ Toxina exfoliatina ▪ Toxina del shock tóxico ▪ Enterotoxinas 	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

Respecto a su identificación, además de la tinción de Gram donde se observan cocos positivos con tendencia a agruparse en racimos. El aislamiento nos permitirá observar las características de las colonias. En medios no selectivos, *Staphylococcus aureus* presenta colonias de 1 a 3 mm de diámetro, lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas y generalmente pigmentadas con un color que puede ir desde el crema al amarillo. Cuando crecen en Agar Sangre se puede observar una zona de β -hemólisis alrededor de las colonias. En las pruebas primarias se tiene que son Catalasa positiva y Oxidasa negativa, al realizar la prueba de coagulasa esta es positiva y la siembra en Agar Sales Manitol resulta positiva. (Koneman, 2008).

1.2.4 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram Negativa, en forma de bacilo no móvil que pertenece a la familia de las Enterobacterias, puede presentar o no cápsula y es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. (López, 2009).

Cabe resaltar que es una bacteria con alta importancia dado que presenta una variedad de enzimas β -lactamasas las cuales pueden destruir las estructuras químicas de los antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenems. (Sirijan, 2016).

Generalmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, debido a que cuenta con lipopolisacáridos que se extienden por encima de la cápsula evitando que su pared celular sea lisada, entonces la cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares inhibiendo la activación del complemento. (López, 2009).

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia del agente a las células del hospedero, función que en este caso es desempeñado por los *pilis*, de los cuales existen dos tipos predominantes en *Klebsiella pneumoniae*; el tipo 1 que tipo está asociado en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, adhiriéndose a las células del túbulo proximal, su adherencia a las células del tracto respiratorio afecta la resistencia a la colonización, lo cual conlleva a la proliferación de patógenos potenciales y puede conducir a neumonía, principalmente en pacientes con ventilación mecánica y el tipo 3 que interviene en la adherencia a las células endoteliales y los epitelios del tracto respiratorio y urinario. (López, 2009).

1.2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram Negativo con flagelos peritricos, que pertenece a la familia de las Enterobacterias, se considera la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento, por lo cual es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad pero existen varios virotipos de *Escherichia coli* implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos. (Iguchi, 2009).

Se han determinado varios virotipos de *Escherichia coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* enterotoxígena (ECET), *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (ECAD). (Tortora, 2007). En el siguiente cuadro se enlistan los factores de patogenicidad asociados a los diferentes virotipos de *Escherichia coli*.

Cuadro 2. Determinantes de patogenicidad de *Escherichia coli*.

Bacteria	Adhesinas	Exotoxinas
ECET	Antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	toxina termolabil (LT-1); Toxina termoestable (STa)
ECEP	Pilis formadores de haces (BFP); intimina	
ECEA	Fimbrias adherentes agregantes (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Toxina termoestable enteroagregante
ECEH	BFP; Intimina	Toxina de shiga (stx-, stx-2)
ECEI	Antígeno del plásmido invasivo	Hemolisina (HlyA)

1.2.6 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii es un bacilo Gram Negativo, inmóvil, no fermentador, oxidasa negativo y catalasa positivo y es considerado como un patógeno oportunista causante de neumonías, asociadas a ventilación, infecciones del tracto urinario, meningitis, bacteriemias, endocarditis y peritonitis. (Cisneros, 2003).

Las características más notables como un patógeno nosocomial son su capacidad de sobrevivir en el ambiente hospitalario (inanimado) y desarrollar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos. (Villar, 2014).

Acinetobacter baumannii habita normalmente en la piel, en las membranas de la mucosa respiratoria y gastrointestinal además puede sobrevivir en el suelo, en superficies húmedas, y a diferencia del resto de bacterias Gram Negativas, puede resistir por un largo periodo en ambientes secos. (Zuñiga, 2010).

Aunque las características especiales del género *Acinetobacter* lo han convertido en patógeno nosocomial exitoso, es poco lo que se ha avanzado en el conocimiento de los factores de virulencia y las estrategias de persistencia. La presencia de pilis como importante factor patogénico ha sido relacionada con la capacidad de la bacteria para adherirse a las superficies plásticas y de vidrio, asegurando la formación de biofilm en instrumentos como los dispositivos médicos. Algunas investigaciones han determinado que durante la etapa de maduración del biofilm se requiere la participación de la proteína asociada a biofilm (Bap), esta proteína que es específica de *Acinetobacter baumannii* se localiza en la membrana externa, facilitando la adhesión intercelular, lo que contribuiría a dar grosor y volumen al biofilm. La potencial habilidad de *Acinetobacter baumannii* para formar biofilm explicaría en gran medida su alta resistencia a los antibióticos y las propiedades de sobrevivencia en el ambiente seco por largos períodos. (Zuñiga, 2010).

1.2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram Negativa con forma de bacilo, cuenta con un flagelo y es móvil, además es aerobio, se considera un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales. Es un habitante común de agua, suelos y plantas y en los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. (Luján, 2014).

Pseudomonas aeruginosa puede causar neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria, dichas infecciones son difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos. (Ochoa, 2013).

Pseudomonas aeruginosa produce una amplia variedad de factores de patogenicidad, por lo tanto, la patogénesis de esta bacteria puede ser descripta como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, pilis, toxinas, exoenzimas y biofilm. Algunos bastante estudiados son el alginato que es un polímero de polisacáridos, que facilita la adherencia a la superficie epitelial pulmonar, es una barrera para los fagocitos, para los antibióticos, inhibe a los anticuerpos y atenúa la respuesta del hospedero. La exotoxina A daña el epitelio alveolar y las células endoteliales pulmonares, inhibe la síntesis de proteínas de la célula hospedera y afecta la respuesta del hospedero a la infección. Otras toxinas vinculadas a la virulencia son exoS, exoT y exoU, las primeras 3 han sido. ExoS y ExoT desorganizan el citoesqueleto de actina de la célula hospedera, bloquean la fagocitosis y causan la muerte celular, en tanto ExoU favorece la inflamación excesiva, incrementa el daño tisular y también causa la muerte celular. (Luján, 2014).

1.3 Generalidades de Levaduras y Fungemia

Las levaduras varían considerablemente en cuanto a tamaño, oscilando entre 1 y 5 μm de anchura y entre 5 a 30 μm de longitud. Cada especie tiene una forma característica, pero aun en cultivo puro, entre las células individuales, existe una considerable variación en el tamaño y la forma que puede ser redondeada, elípticoide o casi cilíndricas. Se reproducen normalmente por bipartición o fisión binaria (casi siempre asimétrica) o por gemación, porque producen unos abultamientos en la célula madre llamados yemas (también llamadas blastoconidios) que crecen hasta separarse. Algunas levaduras pueden filamentosas, es decir, que la yema no se desprende y se van alargando tomando el nombre de pseudohifa, al proliferar las pseudohifas toman el nombre de pseudomicelio (Montoya, 2008).

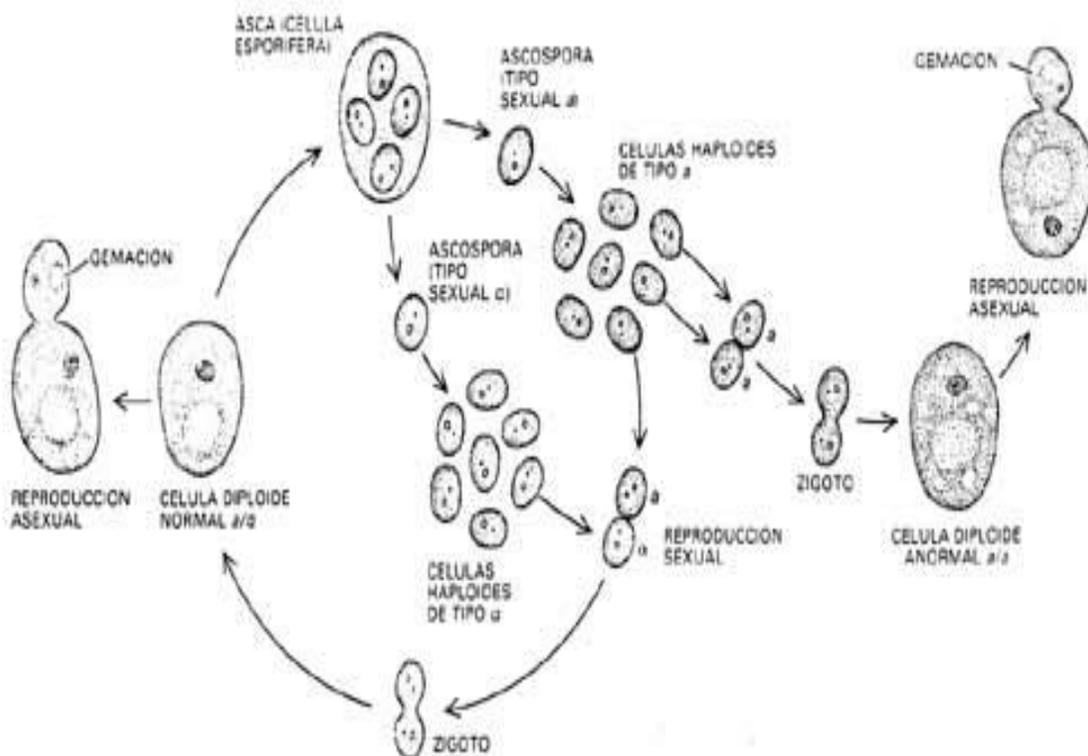


Imagen 5. Tipos de reproducción en levaduras.

Imagen: Ciencias de la tierra, <https://cienciadelatierra.wordpress.com/2010/04/09/budding-y-conjugacion/> (Revisado 11/10/2016)

Pueden crecer como anaerobios facultativos. Pueden utilizar el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor final de electrones; este es un atributo valioso porque permite que estos hongos sobrevivan en diversos ambientes (Tortora, 2007).

En los medios de cultivo sólidos las levaduras crecen dando lugar a colonias compactas, visibles macroscópicamente a las 24-48 horas de incubación muy similares a las bacterianas (Prats, 2005).

Se habla de fungemia cuando el microorganismo aislado en el hemocultivo es un hongo o levadura. La fungemia suele manifestarse de forma inespecífica por un cuadro febril aislado asociado a inmunosupresión, o acompañado de afección orgánica en caso de infección diseminada. (García. 1997).

1.4 Hemocultivo

Un hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por punción venosa sencilla o acceso intravenoso. Es un estudio recomendado para confirmar una bacteriemia cuando ésta se sospecha en pacientes con o sin foco aparente de infección. Un cultivo de sangre positivo sugiere un diagnóstico definitivo en la orientación de una terapia eficaz contra organismos específicos, así como el estudio de patrones de resistencia a antimicrobianos en la terapia médica. Las infecciones del torrente sanguíneo son muy importantes, pues su mortalidad oscila entre 13.6 y 38%. (Sánchez, 2010).

En América Latina, los microorganismos que más se aíslan son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulasa-negativos, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, en México y Argentina son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y levaduras (Sánchez, 2010).

La indicación clásica para obtener hemocultivos, es la sospecha de bacteriemia en pacientes con o sin foco aparente de infección. Los factores clásicos asociados a la presencia de bacteriemia verdadera, son la presencia de calosfríos y fiebre mayor a 38.3°C y la existencia de enfermedades subyacentes severas. (García, s.f).

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, pues los microorganismos son distintos según si se trata de un paciente inmunosuprimido o inmunocompetente, también si se trata de pacientes adultos o pediátricos o si se trata de enfermos que estén o no bajo terapia antimicrobiana. Según la toma de la muestra pueden ser hemocultivos periféricos o centrales (obtenidos a través de un catéter venoso central). (García, s.f).

También pueden clasificarse según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos según si se sospechan bacterias aeróbicas, anaeróbicas, fastidiosos, micobacterias u hongos. Por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), en sistemas semiautomatizados como el sistema Lisis centrifugación o en sistemas automatizados como BACTEC, BacT/Alert, Septichek, etc. (García, s.f).

Es difícil detallar todas las situaciones en las que se deben realizar hemocultivos, pero, de forma general, deben realizarse, antes de la administración de la terapia antimicrobiana sistémica, siempre que exista sospecha clínica de sepsis, meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección intraabdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía, endocarditis y fiebre de origen desconocido (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, tularemia, etc). (González, 2012).

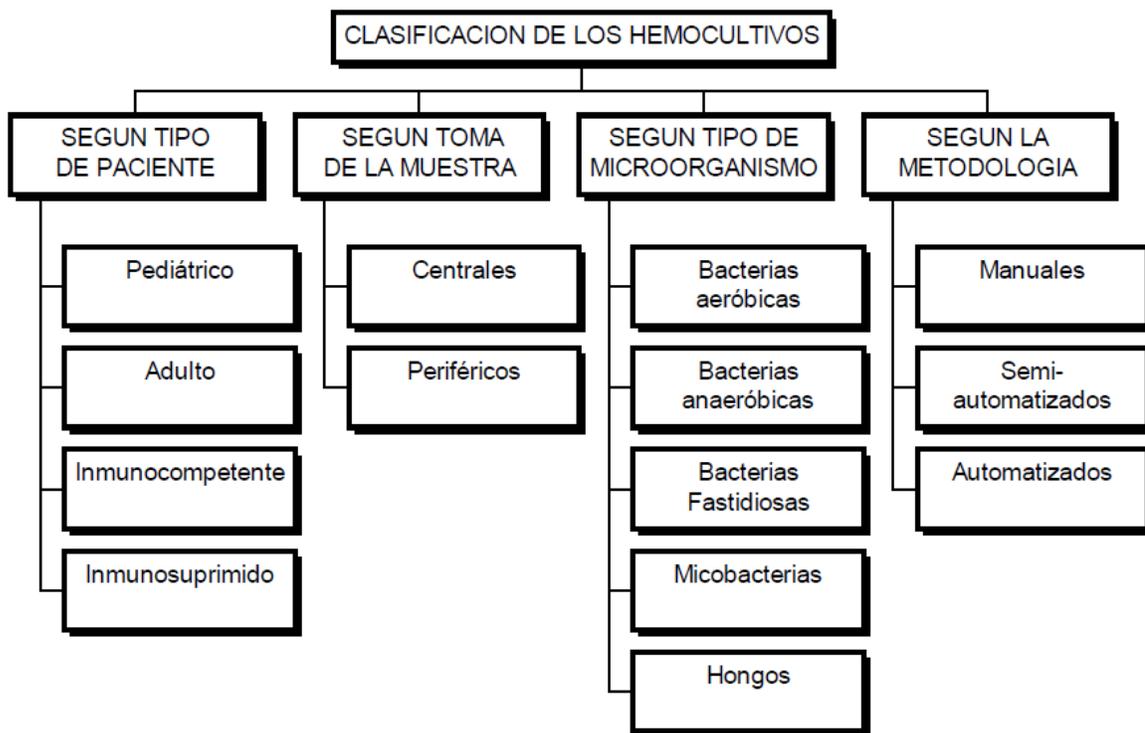


Imagen 6. Clasificación de los hemocultivos.
 García, P. (2015) Hemocultivos. Pontificia Universidad Católica de Chile

Por lo general, un hemocultivo es insuficiente en la búsqueda del microorganismo, dos o más cultivos son adecuados cuando la bacteriemia se debe a un patógeno no contaminante, tres cultivos son adecuado ante la presencia de bacteriemia persistente y cuatro cultivos cuando se sospecha de un germen comúnmente contaminante como los *Staphylococcus coagulasa negativo*. (González, 2012).

Cualquier líquido corporal estéril puede ser invadido e infectado por agentes patógenos como bacterias, si bien provienen de diferentes áreas del cuerpo todas las muestras son estériles en condiciones normales; por lo consiguiente hasta la presencia de una sola colonia de un microorganismo con potencial patógeno puede ser importante. (Forbes, 2009).

La distinción entre bacteriemias verdadera y falsa es un asunto de la máxima importancia y trascendencia para el paciente, debido a que estas se asocian con una elevada mortalidad, que oscila entre el 20 y el 50%. (Rodríguez, 2012).

1.5 Principales microorganismos presentes en hemocultivo

Según un estudio realizado en el Hospital Pediátrico de Sinaloa de febrero del 2012 a febrero del 2013 los microorganismos más frecuentemente aislados en hemocultivos son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*; le siguen en frecuencia *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Cryptococcus laurentii*. (López, 2013).

Tabla 1. Principales microorganismos presentes en hemocultivo.

Nombre	Tipo y Agrupación	Localización	Identificación	Notas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocos G + en Racimos	Bacteria residente de la piel y mucosas sanas del ser humano	Catalasa + Oxidasa - Coagulasa - Manitol -	Anteriormente considerado contaminante con escasa importancia clínica.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos G + en Racimos	Medio ambiente, aunque también forma parte de la microbiota humana normal.	Catalasa + Oxidasa - Coagulasa + Manitol +	Patógeno más importante dentro de los <i>Staphylococcus</i> , principal agente causal de infecciones nosocomiales.
<i>Candida albicans</i>	Levadura	Microbiota de la piel y membranas mucosas, además de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos.	Utilización de CHOS + ChromoAgar	Es el hongo más comúnmente aislado en muestras clínicas.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos G - sin agrupación Flagelado	Presente en agua, tierra, animales o plantas, debido a que sus necesidades alimenticias son mínimas.	Oxidasa + b-hemolisis Piocianina +	Produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro.
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Bacilos G - sin agrupación	Se encuentra en microbiota intestinal.	MIO: - - - - IMViC: - - + +	Enterobacteria de aislamiento clínico frecuente.
<i>Serratia marcescens</i>	Bacilo G - sin agrupación	Es microbiota intestinal, en el ambiente y reservorios pobres en nutrientes.	VP + Motilidad + Indol - DNAsa +	Su adquisición es por lo general nosocomial, asociada a catéter.
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos G - sin agrupación Flagelado	Se encuentra en microbiota intestinal.	IMViC: + + - - Lactosa: +	Existen varios patotipos de <i>Escherichia coli</i> implicados en un amplio espectro de enfermedades agrupados en tres síndromes clínicos.
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Levadura	Medio ambiente, principalmente del suelo contaminado con excrementos secos de palomas y otras aves	Urea -	Es la especie más importante desde el punto de vista médico.

1.6 Sangre y líquidos diversos

En respuesta a la infección, en cualquier cavidad del organismo puede acumularse líquido, estos líquidos deben recolectarse y enviar al laboratorio para estudios microbiológicos entre ellos la inoculación en frascos de hemocultivo. Los líquidos corporales que con mayor frecuencia se estudian en el laboratorio después de la sangre y el cefalorraquídeo, son ascitis, peritoneal, pleural y sinovial. (Pemán, 2007).

Cabe resaltar que en condiciones normales cualquier líquido corporal debe ser estéril, lo consiguiente, hasta la presencia de una sola colonia de un microorganismo con potencial patógeno puede ser importante. (Forbes, 2009).

1.6.1 Sangre

La sangre es un tejido conjuntivo líquido que circula a través del sistema cardiovascular. Al igual que los demás tejidos conjuntivos, el tejido sanguíneo está formado por células y un componente extracelular. El volumen total del adulto normal es de alrededor de 6 L, lo cual equivale al 7 a 8% del peso corporal total. (Ross, 2012).

La sangre es impulsada a través del sistema cardiovascular por la acción de la bomba cardíaca para que llegue a todos los tejidos del organismo. Entre sus funciones se pueden mencionar las siguientes: Transporte de sustancias nutritivas y oxígeno hacia las células en forma directa o indirecta, transporte de desechos y bióxido de carbono desde las células, distribución de hormonas y otras sustancias reguladoras a las células y tejidos, mantenimiento de la homeostasis porque actúa como amortiguador (buffer) y participa en la coagulación y la termorregulación, transporte de células y agentes humorales del sistema inmunitario que protege el organismo de los agentes patógenos, las proteínas extrañas y las células transformadas (es decir, las células del cáncer) (Ross, 2012).

La muestra de sangre para un hemocultivo debe ser tomada por el personal médico o químico, se hace mediante punción periférica venosa o arterial, o a través de un catéter arterial, venoso o central. El personal debe lavarse las manos, colocarse guantes y proceder a desinfectar los tapones de las botellas de hemocultivo con alcohol al 70% y posteriormente con una solución iodada, después se debe seleccionar el sitio de venopunción y desinfectar el área con alcohol al 70%, después en un ambiente totalmente estéril desinfectar nuevamente el área a puncionar con una solución iodada y dejar secar, colocar el torniquete y realizar la punción sin palpar, la muestra se toma directamente en la botella de hemocultivo, por lo cual se debe usar sistema al vacío con una camisa especial. Finalmente después de extraer un volumen de 10 mL de sangre por frasco, retirar el torniquete y el sistema al vacío, y limpiar los restos de solución iodada de la piel del paciente. (Strasinger, 2010).

1.6.2 Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Reconocido por primera vez por Cotugno en 1764. Proporciona un sistema fisiológico para aportar nutrientes al tejido nervioso, eliminar los desechos metabólicos y producir una barrera mecánica para proteger el cerebro y la médula espinal contra el traumatismo. El LCR se produce en los plexos coroideos de los 2 ventrículos laterales y del tercero y el cuarto ventrículos. En los adultos se producen alrededor de 20mL de líquido por hora (Strasinger, 2010).

El LCR suele obtenerse mediante la punción lumbar entre la tercera, cuarta o quinta vértebras lumbares. El volumen requerido que puede extraerse se basa en el volumen disponible en el paciente (adulto o neonato) y la presión de apertura del LCR tomada cuando la aguja entra primero en el espacio subcaracnoideo. (Strasinger, 2010).

Para realizar la punción lumbar el paciente debe recostarse de lado con las rodillas encogidas hacia el abdomen y la barbilla pegada al tórax, se debe limpiar la espalda, e inyectar anestesia local en la región lumbar, después se introduce una aguja espinal y se medirá la presión del líquido cefalorraquídeo y se recogerá una muestra de 10 mL, se retira la aguja y se limpia la zona, finalmente se inoculan las botellas de hemocultivo en un ambiente estéril. (Strasinger, 2010).

Los microorganismos hallados con más frecuencia en infecciones en LCR son *Streptococcus pneumoniae* (Cocos Gram Positivos), *Haemophilus influenzae* (Bacilos Gram Negativos pleomorfos), *Escherichia coli* (Bacilos Gram Negativos) y *Neisseria meningitidis* (Cocos Gram Negativos). Los cocos Gram Negativos, *Streptococcus agalactiae*, y los bacilos Gram Negativos *Listeria monocytogenes* pueden encontrarse en los recién nacidos (Strasinger, 2010).

1.6.3 Líquido sinovial (LS)

A menudo denominado “líquido articular”, es viscoso y se encuentra en las cavidades de las articulaciones móviles (diartrosis) o articulaciones sinoviales. El líquido sinovial se forma como un ultrafiltrado del plasma por la membrana sinovial. (Strasinger, 2010).

El líquido sinovial se obtiene por aspiración con aguja, procedimiento conocido como artrocentesis. La cantidad de líquido presente varía con el tamaño de la articulación y la magnitud del aumento del líquido en ésta. Debe registrarse el volumen de líquido recolectado. El líquido sinovial normal no coagula; sin embargo, el líquido de una articulación enferma puede contener fibrinógeno y coagular. Por consiguiente, el líquido a menudo se recolecta con una jeringa que ha sido humedecida con heparina. (Strasinger, 2010).

La toma de muestra se realizará por personal médico, primero se lavará la piel sobre las articulaciones será lavada y después se colocará una solución iodada, tras dejar secar se utilizará anestesia local para adormecer el tejido en el sitio de la punción. Una aguja deberá ser introducida en el espacio alrededor de la articulación y el líquido se extraerá con la jeringa aproximadamente 10 mL, cuando se tiene la muestra se retira la aguja y se inoculan las botellas de hemocultivo en condiciones de esterilidad. (Strasinger, 2010).

En LS se realizan tinción de Gram y cultivos. Los cultivos bacterianos deben incluir un medio de enriquecimiento, como agar chocolate, porque además de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, otros microorganismos habituales que infectan el líquido sinovial son las especies de *Haemophilus* y *N. gonorrhoeae*, que tienen requerimientos especiales de cultivo. (Strasinger, 2010).

1.6.4 Líquido pleural (LP)

Se obtiene de la cavidad pleural, ubicada entre la membrana pleural parietal que reviste la pared del tórax y la membrana pleural visceral que recubre los pulmones. Para la toma de muestra el paciente deberá estar sentado mientras su cabeza y brazos descansan en una mesa, se limpiara con una solución iodada la zona de punción y se deja secar, posteriormente se inyecta un anestésico local, después la aguja de 20 mL se inserta por encima de la costilla en la cavidad donde se encuentra el líquido, y se extrae el líquido aproximadamente 10 mL por botella de hemocultivo, al obtener la muestra se sacara la aguja, se limpia la zona y se coloca un apósito comprensivo, para finalizar se inoculan las botellas de hemocultivo. (Strasinger, 2010).

Los microorganismos asociados con mayor frecuencia con los derrames pleurales son *Staphylococcus aureus*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobios y *Mycobacterium tuberculosis*. Cuando la clínica lo indica, en el líquido pleural se realizan la tinción de Gram, los cultivos (aerobios y anaerobios), la tinción para ácido-alcohol resistencia y los cultivos para micobacterias. (Strasinger, 2010).

1.6.5 Líquido peritoneal (LP)

La acumulación de líquido entre las membranas peritoneales se denomina llama ascitis y el líquido suele denominarse líquido ascítico en lugar de líquido peritoneal. La tinción de Gram y los cultivos para aerobios y anaerobios se realizan cuando se sospecha peritonitis bacteriana. La siembra de líquido en frascos para hemocultivo a la cabecera del paciente aumenta la recuperación de microorganismos anaerobios. (Strasinger, 2010).

La muestra es tomada con el paciente recostado boca arriba inclinado hacia su lado izquierdo, se selecciona es sitio de punción y se limpiara con una solución iodada, se deja secar y se coloca un anestésico tópico y con ayuda de una jeringa se extraerá un volumen de muestra de hasta 10 mL, retirar la jeringa, limpiar la zona y colocar un apósito comprensivo, finalmente se inoculan las botellas de hemocultivo en un ambiente estéril. (Strasinger, 2010).

Ante la sospecha de tuberculosis pueden solicitarse tinción para cepas ácido-alcohol resistente y algunas pruebas bioquímicas como niacina y cultivos especiales para tuberculosis. (Strasinger, 2010).

1.7 Sistemas automatizados de detección e identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana

En la actualidad se busca acortar los tiempos de detección de microorganismos dentro del laboratorio, para lograr un diagnóstico oportuno, con ese fin se comenzaron a utilizar los sistemas automatizados, dado que estos pueden detectar crecimiento de microorganismos en una suspensión con y sin antimicrobianos, antes de que se pueda observar turbidez, además de disminuir la carga de trabajo dentro del laboratorio.

En el mercado existen diversos modelos según la casa comercial que lo maneje, pero el fundamento es el mismo en todos: Tener una detección e identificación oportuna del microorganismo presente en la muestra.

En la tabla 2 se muestran algunos de los modelos disponibles para la detección de microorganismos en hemocultivos y otros líquidos corporales, entre ellos el que se utilizó en el desarrollo de este trabajo "VersaTrek", mientras que en la tabla 3 se muestran algunos modelos disponibles para la identificación y determinación de sensibilidad bacteriana entre ellos "Vitek 2", sistema utilizado en este trabajo.

Tabla 2. Sistemas automatizados de detección bacteriana.

Equipo	Fundamento	Imagen
<p>Bact-Alert® 3D (BioMérieux)</p>	<p>Sistema automatizado, con capacidad de incubar y detectar microorganismos en 240 muestras. Utiliza botellas con medio de cultivo estéril y con un sensor colorimétrico que cambia de gris a amarillo en presencia de CO₂ producido por el crecimiento de microorganismos. Dichos sensores son escaneados cada 10 minutos, Una vez que el crecimiento es detectado, el sistema emite una alarma sonora y visual y el dato de la muestra es grabado.</p>	 <p>The image shows a dark blue Bact-Alert 3D system. It features a top section with a small screen and a control panel, and a lower section with a large, open door revealing a grid of 240 multi-colored (red, yellow, green, blue) sensor bottles arranged in rows.</p>
<p>VersaTrek® (Thermo Scientific Microbiology)</p>	<p>Sistema automatizado de detección microbiana, detecta cualquier tipo de gas producido o consumido por microorganismos., sus botellas de cultivo utilizan medio “REDOX”, que promueven el consumo y producción de gas, los cambios de presión en las botellas de cultivo es monitoreada cada 24 minutos.</p>	 <p>The image shows a VersaTrek system with a white and purple color scheme. It consists of a vertical rack of 12 glass bottles, each with a white cap and a small sensor. A central control panel with a screen is visible on the right side of the rack.</p>
<p>BATEC FX® (Becton Dickinson)</p>	<p>Sistema automatizado de hemocultivos que permite el crecimiento y la detección de microorganismos con una monitorización continua. Cuenta con sensores fluorescentes que permite realizar la detección de microorganismos, ya que los frascos cuentan con sensores que responden a los cambios en el contenido de gas producido, los sensores fluorescentes miden nivel de fluorescencia el cual corresponde a la cantidad de dióxido de carbono liberado por los organismos. La medición es interpretada por el sistema de acuerdo con parámetros pre-programados de positividad. Se considera no invasivo al no perforar las botellas.</p>	 <p>The image shows a BATEC FX system, a tall, grey, rectangular unit. A large, multi-colored (red, yellow, green, blue) sensor probe is visible, extending from the top of the unit down towards a control panel at the bottom.</p>

Tabla 3. Sistemas automatizados de identificación bacteriana y determinación de la sensibilidad antimicrobiana.

Equipo	Fundamento	Imagen
<p>Abactor II® (Menarini Diagnostics)</p>	<p>Sistema semiautomatizado que identifica bacterias Gram Negativas y determina la sensibilidad antimicrobiana. Utiliza 3 tipos de rotores que incluyen pruebas bioquímicas y antibióticos que son inoculados con una suspensión bacteriana. Basado en técnicas de dilución en medio líquido.</p>	
<p>Phoenix® (Becton Dickinson)</p>	<p>Sistema automatizado para realizar simultáneamente de 1 a 100 determinaciones de identificación bacteriana y de sensibilidad antimicrobiana. El Sistema Phoenix utiliza sustratos cromogénicos y fluorogénicos, así como sustratos con fuentes de carbono únicas para la identificación de los microorganismos.</p>	
<p>MicroScan WalkAway® (Dade Behring)</p>	<p>Sistema automatizado, para la identificación de bacterias así como la determinación de sensibilidad antimicrobiana, realiza la incubación, adición de reactivos y la lectura de los paneles. Utiliza tecnología de fibras ópticas que permite la lectura espectrofotométrica de todo el panel simultáneamente.</p>	
<p>Vitek 2® (BioMérieux)</p>	<p>Sistema automatizado para la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad antimicrobiana. Utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Tiene un sistema óptico de transmitancia el cual permite la interpretación de las reacciones de prueba utilizando diferentes longitudes de onda en el espectro visible.</p>	

1.8 Sistema de detección bacteriana “Thermo Scientific VersaTrek”

Es un sistema automatizado de detección microbiana, puede detectar cualquier tipo de gas producido o consumido por microorganismos. Al no limitarse a la producción de CO₂, como otros sistemas, “Thermo Scientific VersaTrek” puede detectar una gama más amplia de microorganismos, tanto los que tienen requisitos especiales de cultivo como los de cultivo sencillo, entre los microorganismos que detecta se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brucella suis*, *Helicobacter spp*, *Nocardia spp*, y *Candida*. (Thermo Fisher, 2011).

Emplea medios únicos “REDOX” para promover tanto el consumo como la producción de gas, detectando cambios de la presión en el espacio superior de la botella, los medios “REDOX” altamente enriquecidos admiten una amplia variedad de microorganismos, con lo que se mejora la capacidad de “VersaTrek” para recuperar más fácilmente microorganismos que tienen requisitos especiales de cultivo. Dos medios son suficientes por paciente pues existen para microorganismos aerobios y anaerobios. (Thermo Fisher, 2011).



Imagen 7. Equipo “Thermo Scientific VersaTrek”.



Imagen 8. Medios “REDOX” para “VersaTrek”.

Imagen: Thermo Scientific <http://www.trekds.com/products/versatrek/media.asp> (Revisado 19/10/2016)

“VersaTrek” detecta el crecimiento mico-bacteriano monitorizando automáticamente la tasa de consumo de oxígeno en el espacio de cabeza del frasco de cultivo cada 24 minutos. “VersaTrek” tiene un software que ofrece acceso con un solo botón a todos los resultados y muestras de pacientes. El software muestra los resultados mediante gráficas “Presión vs Tiempo (hrs)” para ver el desarrollo del microorganismo con el paso de los días. (Thermo Fisher, 2011).

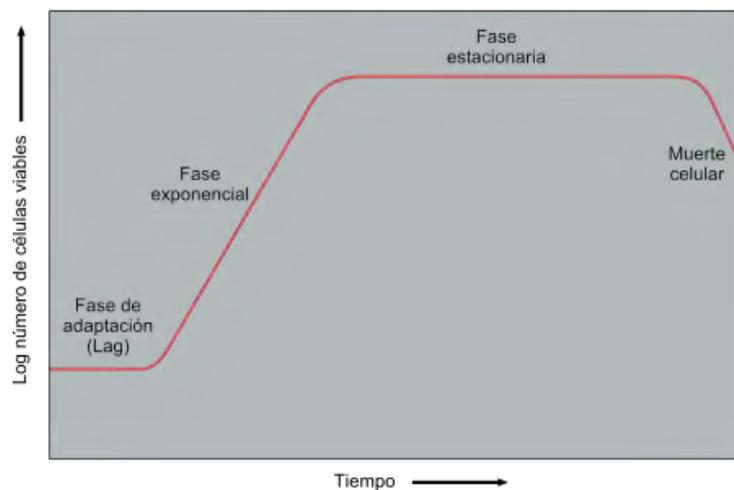


Imagen 9. Curva de crecimiento bacteriano

Imagen: Bacteria., <https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria> (Revisado 20/10/2016).

Con su exclusiva tecnología de detección se consiguen resultados más rápidos con menos restricciones, reduciendo así el tiempo de estancia y los costos de tratamiento, lo cual repercute en la mejora de los cuidados al paciente. (Thermo Fisher, 2011).

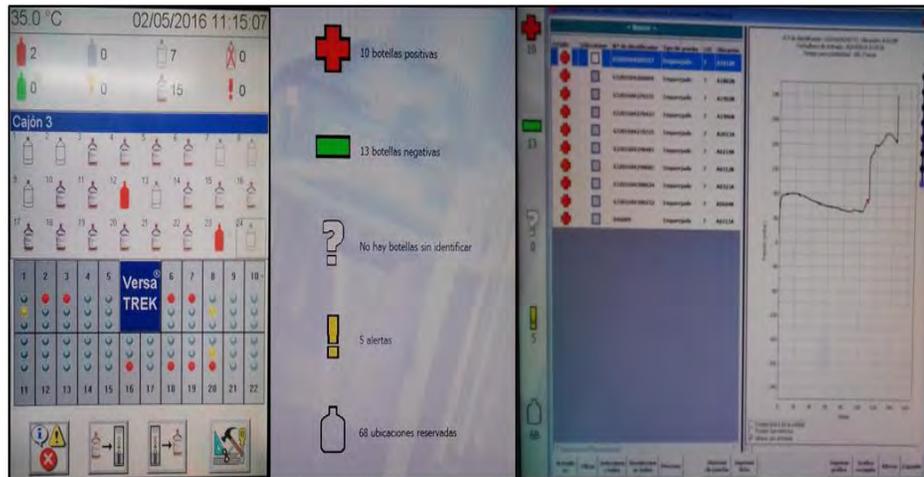


Imagen 10. Software que incluye “Thermo Scientific VersaTrek”.

1.9 Sistema de identificación y sensibilidad bacteriana “Vitek 2”

Es un sistema automatizado para la identificación bacteriana y el estudio de la sensibilidad antimicrobiana; este sistema utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. (BioMérieux, 2006).



Imagen 11. Sistema de identificación y sensibilidad bacteriana “Vitek 2”.

Imagen: BioMérieux <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare> (Revisado 19/10/2016)

El sistema “Vitek 2” cuenta con los instrumentos para la preparación de la muestra, incubación, interrogación óptica y estuche para la prueba. Entre ellos el “DensiChek” que es un densitómetro óptico, el cual es utilizado para la estandarización del inóculo de la muestra, “DensiChek” mide la densidad óptica de una suspensión de microorganismo, proporciona valores en unidades McFarlad, proporcional a las concentraciones de microorganismos. (BioMérieux, 2006).



Imagen 12. “DensiChek” equipo incluido con “Vitek 2”.

Otro instrumento con el que cuenta el sistema “Vitek 2” es “Smart Carrier Station” la cual consiste en una computadora tipo PC, un escáner de código de barras conectado a la computadora y un cassette con capacidad para hasta 15 tarjetas. El escáner de códigos se encarga de vincular de manera virtual el tipo de tarjeta que se utilizará en el cassette con el sistema “Vitek 2” permitiendo la correcta lectura de cada tarjeta utilizada. (BioMérieux, 2006).

Después de preparar y estandarizar el inóculo, el sistema “Vitek 2” lleva a cabo todas las tareas necesarias para complementar la identificación y las pruebas de susceptibilidad como la dilución del inóculo, llenado del estuche de prueba, sellado y transferencia al incubador, monitoreo de los cambios metabólicos, transferencia de los resultados a la estación de trabajo y descarte de los estuches de prueba. (BioMérieux, 2006).

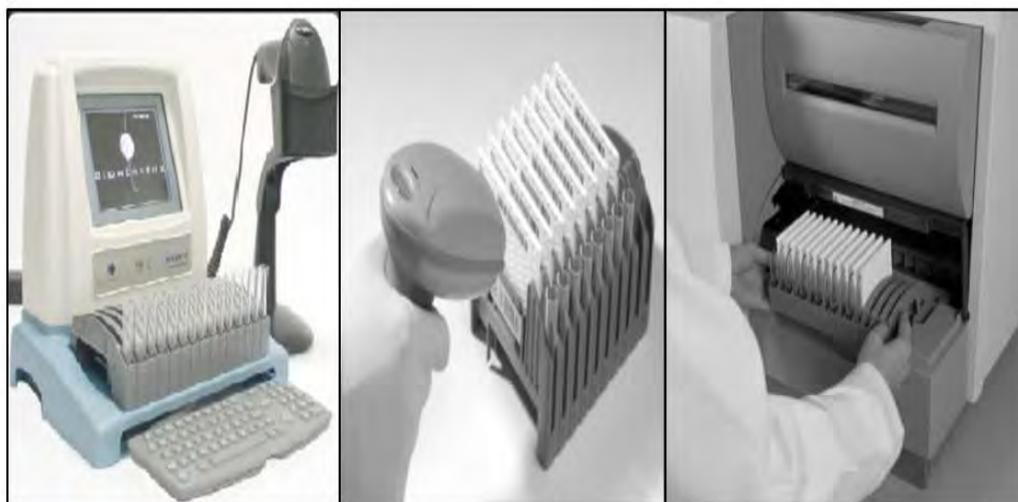


Imagen 13. “Smart Carrier Station” incluido con “Vitek 2”.

Imagen: BioMérieux, <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admin/tablas/productos/VitekCompact.pdf>
(Revisado 19/10/2016)

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos, cada uno contiene un sustrato de prueba individual, estos sustratos miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, etc. Existen varios tipos de tarjetas reactivas disponibles para la identificación de diferentes clases de organismos: GN (Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores), GP (Cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos) y YST (Levaduras y organismos levaduriformes). (BioMérieux, 2006).



Imagen 14. Tarjetas Reactivas de” Vitek 2”.

Imagen: BioMérieux <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare> (Revisado 19/10/2016)

En las siguientes tablas se muestran los sustratos que contienen los diferentes tipos de tarjetas de identificación GP, GN y YST.

Tabla No. 4 Pruebas que contiene la tarjeta GP. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
2	D-AMYGDALYN	53	D-MANNOSE
4	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	54	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE
5	D-XYLOSE	56	PULLULAN
8	ARGININE DIHYDROLASE 1	57	D-RAFFINOSE
9	BETA-GALACTOSIDE	58	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)
11	ALPHA-GLUCOSIDASE	59	SALICIN
13	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	60	SACCHAROSE/SUCROSE
14	CYCLODEXTRIN	62	D-TREHALOSE
15	L-Aspartate ARYLAMIDASE	63	ARGININE DIHYDROLASE 2
16	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	64	OPTOCHIN RESISTANCE
17	ALPHA-MANNOSIDASE		
19	PHOSPHATASE		
20	Leucine ARYLAMIDASE		
23	L-Proline ARYLAMIDASE		
24	BETA GLUCURONIDASE		
25	ALPHA-GALACTOSIDASE		
26	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE		
27	BETA-GLUCURONIDASE		
28	Alanine ARYLAMIDASE		
29	Tyrosine ARYLAMIDASE		
30	D-SORBITOL		
31	UREASE		
32	POLYMIXIN B RESISTANCE		
37	D-GALACTOSEE		
38	D-RIBOSE		
39	L-LACTATE alkalization		
42	LACTOSE		
44	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE		
45	D-MALTOSE		
46	BACITRACIN RESISTANCE		
47	NOVOBIOCIN RESISTANCE		
50	GROWTH IN 6.5% NaCl		
52	D-MANNITOL		

Tabla No. 5 Pruebas que contiene la tarjeta GN. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	47	ORNITHINE DECARBOXYLASE
3	ADONITOL	48	LYSINE DECARBOXYLASE
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	52	DECARRBOXYLASE BASE
5	L-ARABITOL	53	L-HISTIDINE assimilation
7	D-CELLOBIOSE	56	COUMARATE
9	BETA-GALACTOSIDASE	57	BETA-GLUCORONIDASE
10	H2S PRODUCTION	58	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)
11	BETA-N-ACETYL-GUCOSAMINIDASE	59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE
12	Glutamyl Arylamidase pNA	61	L-MALATE assimilation
13	D-GLUCOSE	62	ELLMAN
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	64	L-LACTATE assimilation
15	FERMENTATION GLUCOSE		
17	BETA-GLUCOSIDASE		
18	D-MALTOSA		
18	D-MANNITOL		
20	D-MANNOSA		
21	BETA-XYLOSIDASE		
22	BETA-Alnine arylamidase pNA		
23	L-Proline ARYLAMIDASE		
26	LIPASE		
27	PALATINOSE		
29	Tyrosine ARYLAMIDASE		
31	UREASE		
32	D-SORBITOL		
33	SACCHAROSE/SUCROSE		
34	D-TAGATOSE		
35	D-TREHALOSE		
36	CITRATE (SODIUM)		
37	MALONATE		
39	5-KETO-D-GLUCONATE		
40	L-LACTATE alkanisation		
41	ALPHA-GLUCOSIDASE		
42	SUCCINATE alkanisation		
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE		
44	ALPHA-GAÑACTOSIDASE		
45	PHOSPHATASE		
46	Glycine ARYLAMIDASE		

Tabla No. 6 Pruebas que contiene la tarjeta YST. (BioMérieux, 2006).

# Pozo	Prueba	# Pozo	Prueba
3	L-Lysine-ARYLAMIDASE	48	D-TREHALOSE assimilation
4	L-MALATE assimilation	49	NITRATE assimilation
5	Leucine-ARYLAMIDASE	51	L-ARABINOSE assimilation
7	ARGININE GP	52	D-GALACTURONATE assimilation
10	ERYTHRITOL assimilation	53	ESCULIN assimilation
12	GLYCEROL assimilation	54	L-GLUTAMATE assimilation
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	55	D-XYLOSE assimilation
14	BETA-N-ACETYL- GLUCOSAMINIDASE	56	DL-LACTATE assimilation
15	ARBUTIN assimilation	58	ACETATE assimilation
18	AMYGDALIN assimilation	59	CITRATE (SODIUM) assimilation
19	D-GALACTOSE assimilation	60	GLUCURONATE ASSIMILATION
20	GENTIOBIOSE assimilation	61	L-PROLINE assimilation
21	D-GLUCOSE assimilation	62	2-KETO-D-GLUCONATE assimilation
23	LACTOSE assimilation	63	N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation
24	METHYL-A-D- GLUCOPYRANOSIDE assimilation	64	D-GLUCONATE assimilation
26	D-CELLOBIOSE assimilation		
27	GAMMA-GLUTAMYL- TRANSFERASE		
28	D-MALTOSE assimilation		
29	D-RAFFINOSE assimilation		
30	PNP-N-acetyl-BD- galactosaminidase 1		
32	D-MANNOSE assimilation		
33	D-MELIBIOSE assimilation		
34	D-MELEZITOSE assimilation		
38	L-SORBOSE assimilation		
39	L-RHAMNOSE assimilation		
40	XYLITOL assimilation		
42	D-SORBITOL assimilation		
44	SACCHAROSE/SUCROSE assimilation		
45	UREASE		
46	ALPHA-GLUCOSIDASE		
47	D-TURANOSE assimilation		

El sistema “Vitek 2” tiene un sistema óptico de transmitancia el cual interpreta las reacciones de prueba utilizando diferentes longitudes de onda en el espectro visible, durante la incubación que se lleva a cabo en un carrusel a temperatura controlada cada pozo es examinado por el escáner de 10 a 14 veces cada 15 minutos, para medir la turbidez o los productos coloreados del metabolismo del sustrato, permitiendo un análisis cinético preciso. (BioMérieux, 2006).

El equipo cuenta con un software que contiene una base de datos de los resultados de los productos de identificación cada uno de los resultados obtenidos se compara con los de la base de datos para determinar si los datos son suficientemente únicos o cercanos a uno o más de los de la base de datos para identificar al microorganismo. Si el software no reconoce un patrón de identificación único, se reporte una lista de microorganismos posibles o se determina que la cepa está fuera del alcance de la base de datos. (BioMérieux, 2006).

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la dificultad que se presenta en muchas ocasiones para aislar los microorganismos de los hemocultivos y líquidos diversos, existe un elevado porcentaje de muestras que se reportan como falsos negativos, aun cuando clínicamente son claras sospechas de infección, esto puede deberse a que los microorganismos se encuentren interiorizados o interactuando de alguna manera con las células presentes.

La metodología propuesta y probada en este trabajo tuvo como finalidad disminuir significativamente el número de muestras reportadas como negativos, para permitir la recuperación de los microorganismos y su identificación.

2.1 Hipótesis

Si se realizan lisis celular, concentrado y enriquecimiento de microorganismos de hemocultivo y líquidos diversos negativos, entonces se pueden recuperar e identificar disminuyendo significativamente el porcentaje de pruebas reportadas erróneamente como negativos.

2.2 Objetivo General

Recuperar microorganismos de hemocultivos y líquidos diversos negativos compatibles con sospecha de infección mediante lisis celular, concentración e inducción de crecimiento para su identificación y diagnóstico.

2.3 Objetivos Particulares

- Seleccionar hemocultivos y líquidos diversos que cumplan con los criterios de inclusión.
- Recuperar los microorganismos mediante lisis celular.
- Inducir el crecimiento de microorganismos con ayuda de un medio enriquecido.
- Identificación de los microorganismos aislados a través de la tecnología del equipo "Vitek 2".

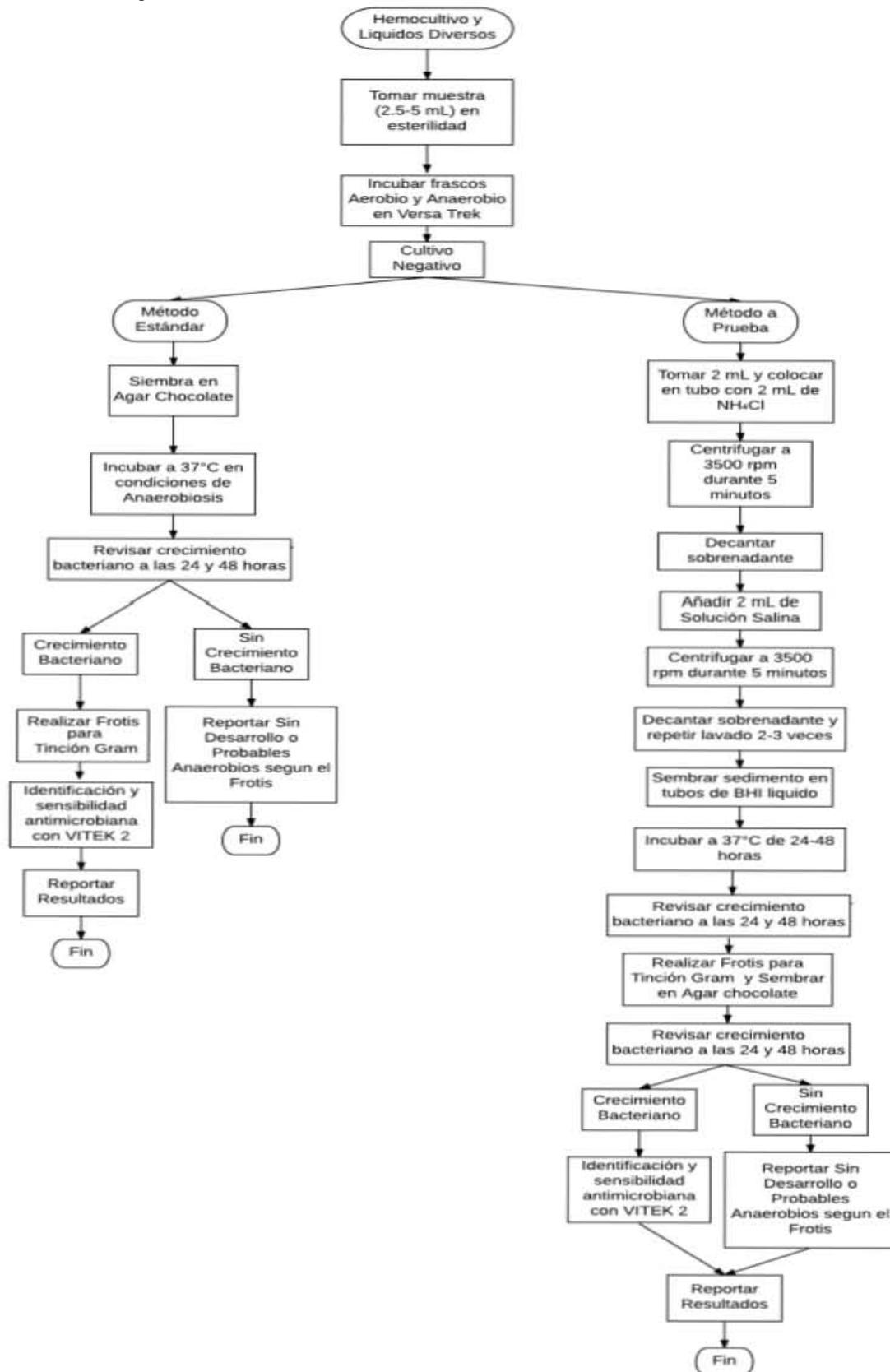
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el análisis de hemocultivos y líquidos diversos referidos como negativos por el sistema de hemocultivo “VersaTrek”, obtenidos en la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI en los días viernes a sábados de Febrero a Mayo del 2016 hasta completar 150 muestras.

Criterios de inclusión: Muestras que el equipo reportara como negativas de viernes a sábado del periodo previamente mencionado, teniendo como limitante el material con el que se contaba, es decir, se tomaba el número de muestras a analizar por el método de prueba igual al número de tubos con el que se contaba.

Criterios de exclusión: Debido a que se contaba con material limitado por día de trabajo, la falta de material para la realización de la prueba era el criterio de exclusión.

Diagrama de Flujo



Los hemocultivos y líquidos diversos fueron tomados con técnica estéril por el personal Médico y del Laboratorio en frascos con medio aerobio y anaerobio, en el que se le colocó la muestra de 5 mL máximo. Al llegar las muestras al laboratorio, se incubaron en el sistema de hemocultivo “VersaTrek” por un máximo de 7 días que es el tiempo que dura el protocolo de dicho equipo. Si en ese lapso de tiempo no se detecta la presencia de microorganismos se determina como negativo.

Se procedió a realizar el **método estándar** dentro del laboratorio, el cual consistió en tomar una pequeña alícuota de la muestra y se sembró en agar Chocolate, se incubó en ambiente de Anaerobiosis a 37°C, se revisaron los medios a las 24 y 48 horas, si se observó crecimiento bacteriano, se realizó un frotis para tinción de Gram y se procedió a identificar el microorganismo identificado con el sistema “VITEK 2”, mediante el uso de tarjetas de identificación del equipo, el criterio para la selección del tipo de tarjeta a utilizar fue lo observado en los frotis de la tinción de Gram, (GP para bacterias Gram Positivas, GN para bacterias Gram Negativas, ANC para bacterias anaerobias y YST para levaduras).

Para la identificación en el “VITEK 2” se realizó una suspensión del microorganismo a identificar en tubos con solución salina al 0.45%, dicha suspensión fue ajustada entre 0.55-0.65 para bacterias y en el caso de levaduras fue al 2.1 de McFarland con ayuda del equipo “DensiChek”.

Cuando se tuvo la suspensión se colocó el tubo en el cassette “Smart Carrier Station”, y se procedió a ingresar en el sistema las tarjetas específicas para cada tipo de microorganismo (GP,GN, YST,) mediante el uso de un lector de códigos de barras y su posterior ingreso al equipo.

Para el **método a evaluar** (Recuperación de microorganismos de los frascos de hemocultivos), se tomó una alícuota de 2 mL de muestra, se colocaron en tubos con rosca que contienen 2 mL de solución de NH₄Cl 0.4M estéril, se dejó reposar durante 2 minutos, se agitaron y se centrifugaron a 3500rpm/5min, se decantó y desechó el sobrenadante de cada uno.

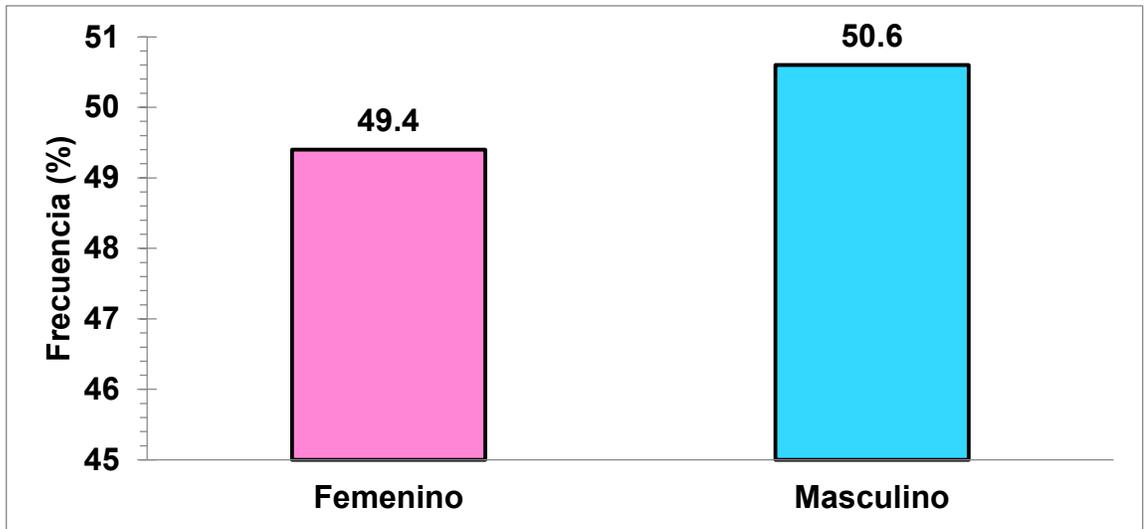
Posteriormente se sometieron a lavados con solución salina; la pastilla obtenida se sembró en medio líquido BHI (2 mL) incubándose a 37°C de 24-48 horas y se observó si existió crecimiento. Se realizaron frotis de todos los tubos con BHI para su posterior tinción de Gram y por último se volvió a sembrar en agar Chocolate.

Finalmente el crecimiento bacteriano en el agar Chocolate fue identificado con el sistema "VITEK 2", de la misma manera que el método estándar, mediante el uso de tarjetas para la identificación del mismo modo anteriormente mencionado.

Se realizaron los controles negativo y positivo, siguiendo ambos procedimientos anteriormente descritos. Para el control negativo se utilizó un frasco de hemocultivo sin inocular microorganismos. Para el control positivo el frasco de hemocultivo se inoculó una bacteria conocida: *Staphylococcus aureus*.

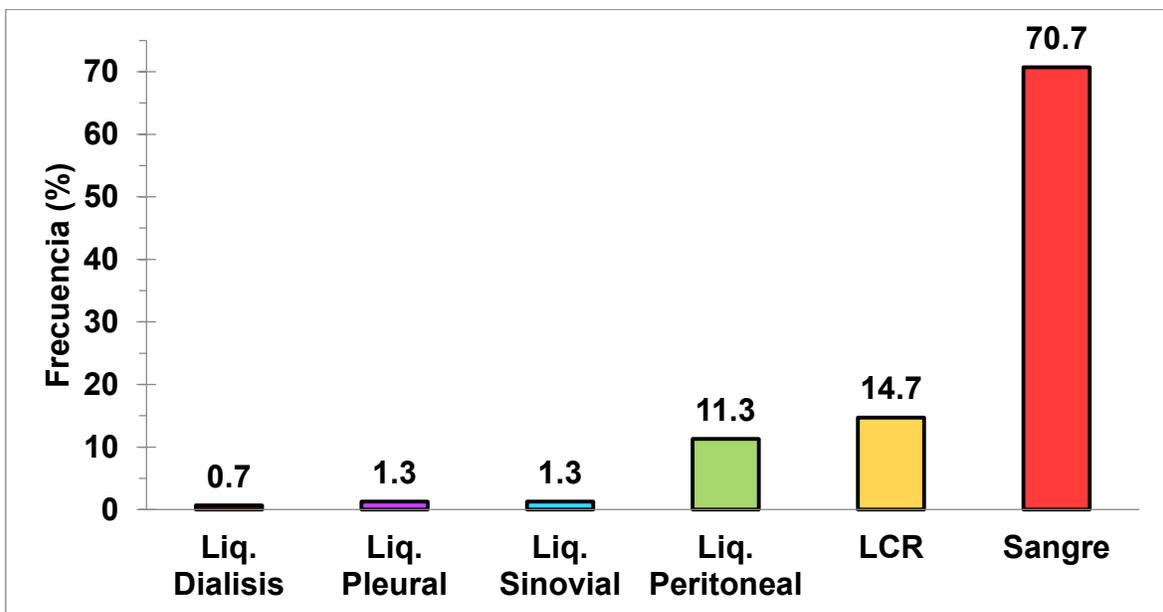
CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Se realizó una estadística para determinar la frecuencia (%) de pacientes por género, obteniendo que de 150 pacientes el 49.4% (74) fueron mujeres y el 50.6% (76) fueron hombres.



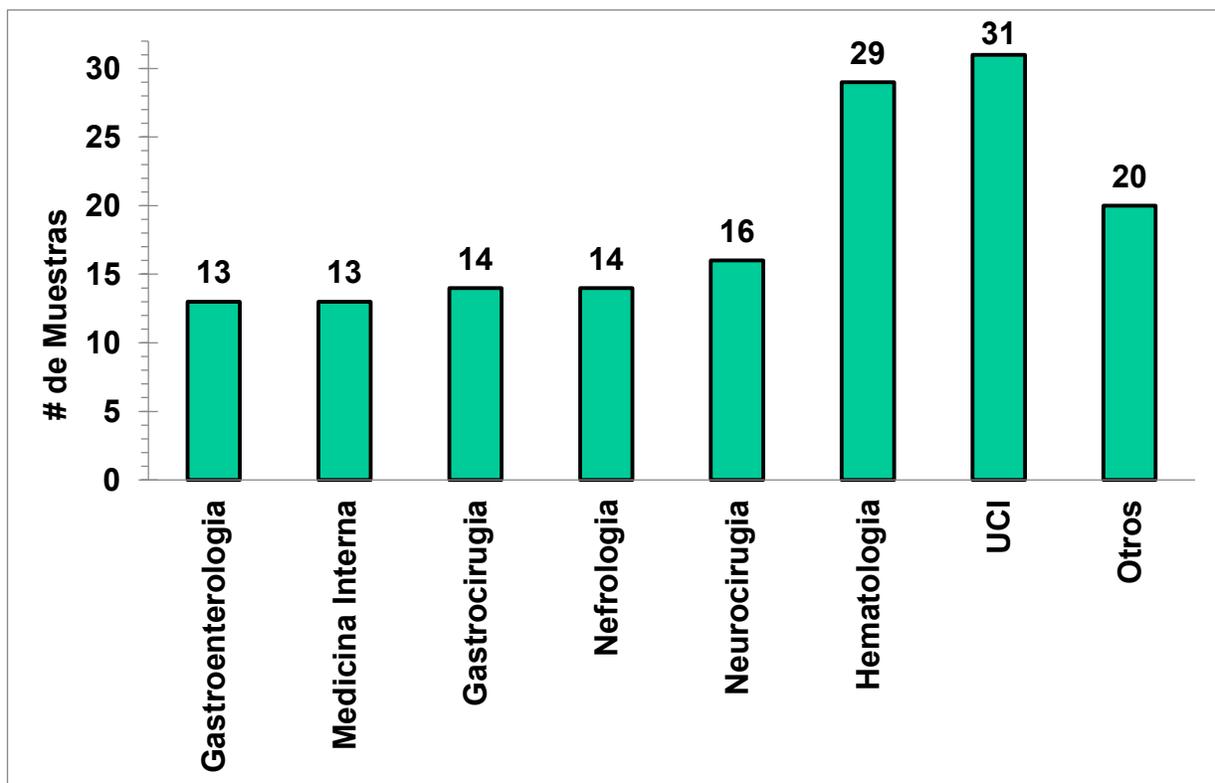
Gráfica 1. Relación de género en las muestras obtenidas.

Se agruparon los hemocultivos con base a los tipos de muestras utilizadas, teniendo que de un total de 150 Hemocultivos trabajados se encontraron 106 muestras de sangre (70.7%), 22 muestras de líquido cefalorraquídeo (14.7%), 17 muestras de líquido peritoneal (11.3 %), 2 muestras de líquido sinovial y pleural (1.3%) y 1 muestra de líquido de diálisis (0.7%).



Gráfica 2. Distribución con base en el tipo de muestra analizada.

Los servicios médicos que presentaron mayor número de muestras de hemocultivos fueron Unidad de Cuidados Intensivos, seguido de Hematología, Neurocirugía, Nefrología, Gastrocirugía, Medicina Interna y Gastroenterología.



Gráfica 3. Frecuencia de muestras por unidad de cuidado del hospital.

Después de la realización del método a probar se lograron identificar 76 microorganismos mediante el sistema de “Vitek 2”, los resultados obtenidos se agruparon en las siguientes tablas donde se muestra el nombre del microorganismo así como el resultado obtenido mediante el método estándar.

Tabla 4. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continúa siguiente hoja). (Continuación).

# de Muestra	Tipo de Muestra	Método Estándar	Método Prueba
1	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
2	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Streptococcus alactolyticus</i>
3	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
8	Hemocultivo	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
9	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
10	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
12	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
14	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
15	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Granulicatella adiacens</i>
16	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
18	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
19	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
20	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
21	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Streptococcus mitis/ oralis</i>
22	Hemocultivo	Falso Negativo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>
24	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus warneri</i>

Tabla 5. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# de Muestra	Tipo de Muestra	Método Estándar	Método Prueba
25	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Micrococcus luteus/lylae/</i> <i>Enterococcus casseliflavus</i>
26	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Cronobacter sakazakii</i>
27	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Micrococcus luteus/lylae</i>
28	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
29	Hemocultivo	Falso Negativo	<i>Staphylococcus warneri</i>
30	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus aureus</i>
31	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>
32	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Kocuria kristinae</i>
33	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
34	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>
35	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
36	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Micrococcus luteus/lylae/Kocuria rosea/</i> <i>Staphylococcus lentus</i>
37	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
38	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
39	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
40	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
41	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus capitis</i>
42	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus capitis</i>
43	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
44	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
45	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
46	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
47	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Gardnerella vaginalis</i>
48	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

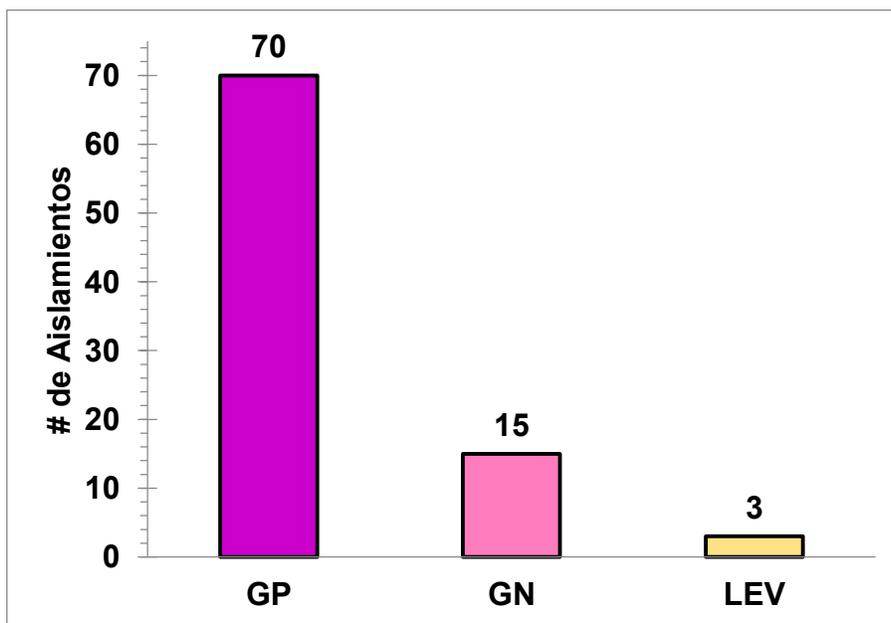
Tabla 6. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# de Muestra	Tipo de Muestra	Método Estándar	Método Prueba
49	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
50	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Candida glabrata</i>
51	Hemocultivo	Sin Desarrollo	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>
52	LCR	Sin Desarrollo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
53	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus lentus/Enterococcus casseliflavus/ Serratia odorifera</i>
54	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus cohnii ssp urealyticus</i>
55	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>
56	LCR	Sin Desarrollo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
57	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
58	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
59	LCR	Sin Desarrollo	<i>Cryptococcus laurentii / Escherichia coli</i>
60	LCR	Sin Desarrollo	<i>Cryptococcus laurentii</i>
61	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
62	LCR	Sin Desarrollo	<i>Brevundimonas diminuta/vesicularis</i>
63	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus warneri</i>
64	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis/ Staphylococcus lentus/Alloiococcus otitis</i>
65	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis/Granulicatella adiacens</i>
66	LCR	Sin Desarrollo	<i>Streptococcus mitis/ oralis/ Staphylococcus capitis</i>
67	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
68	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
69	LCR	Sin Desarrollo	<i>Kocuria varians</i>
70	LCR	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
71	LD	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus warneri</i>

Tabla 7. Identificación de microorganismos por el método estándar y método prueba (Continuación).

# de Muestra	Tipo de Muestra	Método Estándar	Método Prueba
72	Liq Peritoneal	Sin Desarrollo	<i>Kocuria kristinae</i>
73	Liq Peritoneal	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
74	Liq Peritoneal	Falso Negativo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
75	Liq. Pleural	Sin Desarrollo	<i>Micrococcus luteus/lylae</i>
76	Liq. Pleural	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
77	LS	Sin Desarrollo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>/Micrococcus luteus/lylae</i>

Los microorganismos aislados por el método a probar se agruparon según su tinción de Gram, en Gram Positivos (GP), Gram Negativos (GN) y Levaduras (LEV), encontrando que son mas comunes las GP, seguidas de las GN y finalmente las LEV.



Gráfica 4. Microorganismos aislados agrupados por tinción de Gram.

En la siguiente imagen se observa una bacteria Gram Positiva, identificada como *Staphylococcus epidermidis*, el frotis pertenece a la muestra número 3 obtenida de un hemocultivo.

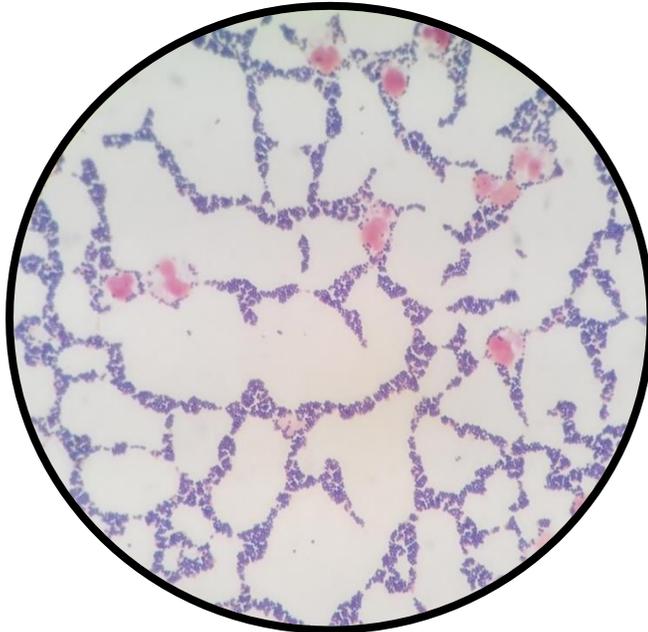


Imagen 15. *Staphylococcus epidermidis* Tinción Gram 100x.

En este frotis de la muestra 22 obtenida de un Hemocultivo se observa una bacteria Gram Negativa, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*,

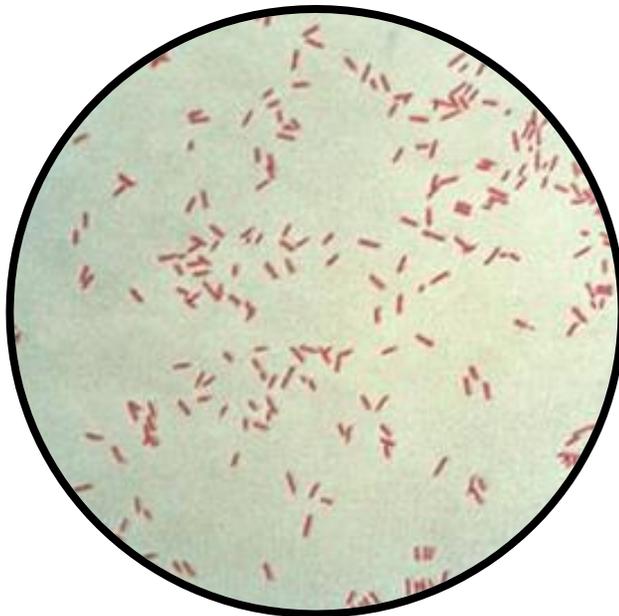


Imagen 16. *Pseudomonas aeruginosa* Tinción Gram 100x.

Finalmente se encontró una levadura identificada como *Candida glabrata*, en la muestra es 50 obtenida de un hemocultivo.

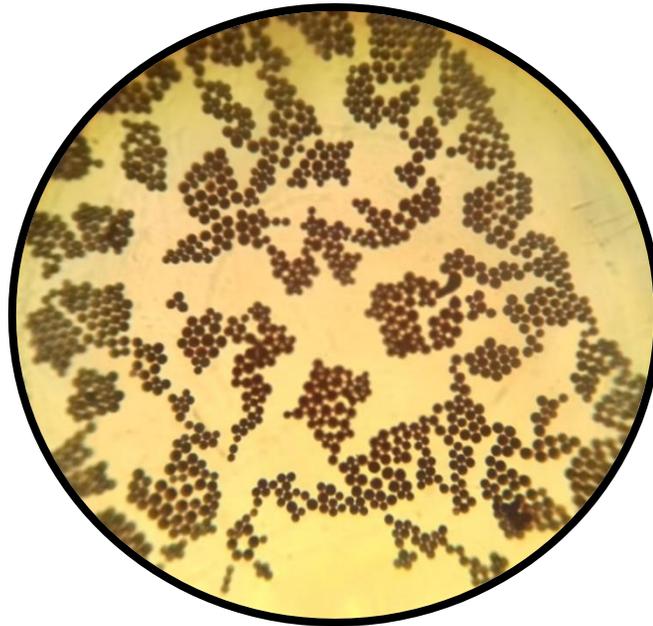
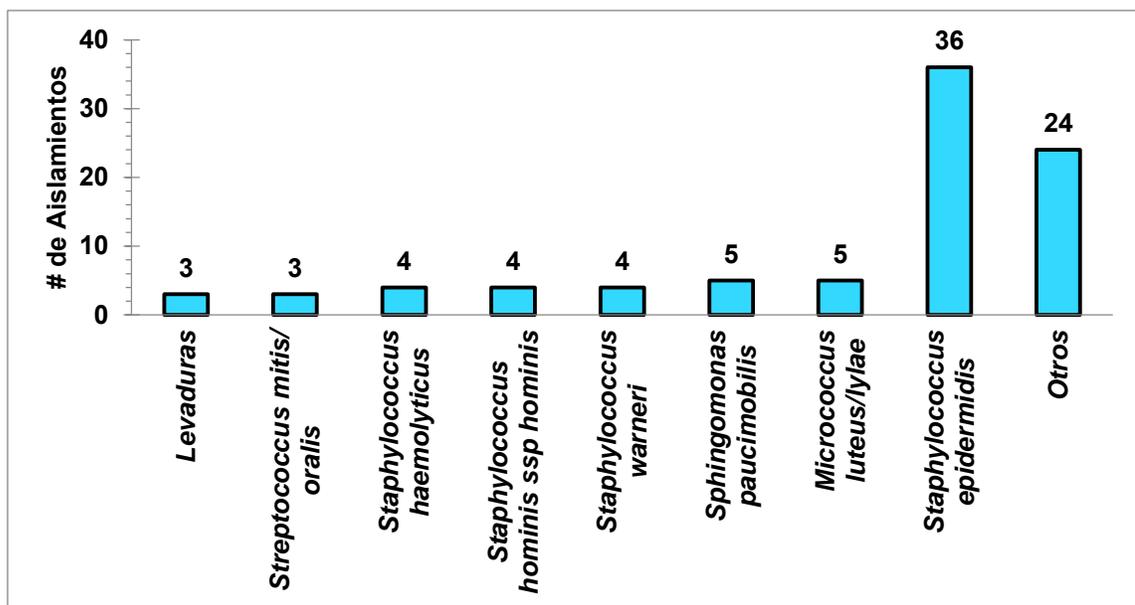


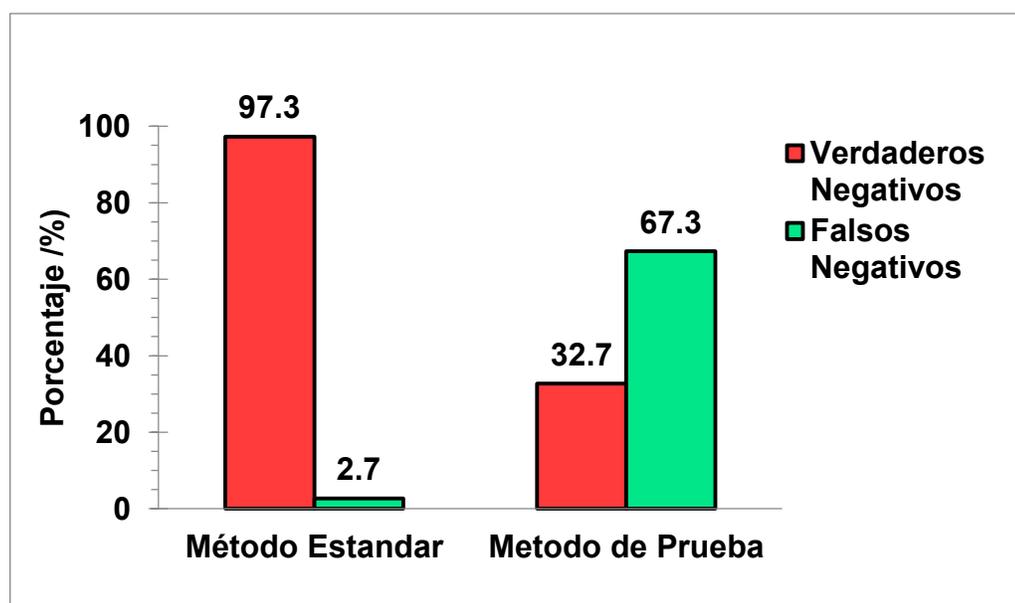
Imagen 16. *Candida glabrata* Tinción Gram 100x.

Las bacterias más aisladas agrupadas por el método utilizado se señalan en la siguiente gráfica.



Gráfica 5. Microorganismos más aislados después del tratamiento Identificados por el equipo "Vitek 2".

Se determinó el porcentaje de verdaderos negativos y falsos negativos comparando los resultados entre ambos métodos, encontrando que mediante el método estándar de oro se encontró 97.3% (146) de verdaderos negativos y 2.7% (4) de falsos negativos, mientras que con el método prueba se obtuvo 32.7% (49) de verdaderos negativos y 67.3% (101) de falsos negativos. Cabe resaltar que se tomaron en cuenta los que crecieron en el medio BHI como criterio para determinar si fueron falsos o verdaderos negativos.



Gráfica 6. Comparación de % de Verdaderos Negativos y Falsos Negativos por método.

Con el método prueba se logró una mayor recuperación de microorganismos y por consiguiente una mayor identificación de los mismos, a diferencia del método estándar donde la recuperación e identificación fue de mínima a nula.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el laboratorio del hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI la incidencia de hemocultivos es de 750 en promedio al mes y el índice de recuperación de hemocultivos es de hasta 10%, que es muy bajo, de ahí la importancia del presente trabajo, ya que con el procedimiento empleado se logró incrementar en más de 60%.

Se requieren inóculos grandes para la correcta detección, tal como lo menciona Rodríguez en el Manual de Neonatología en el 2012. “Esto debido a que se requiere de un gran inóculo 10^5 , a fin de esperar cultivos positivos”.

El paso crucial en la metodología es el uso de la solución de NH_4Cl , para provocar lisis celular, pues al poseer éste una carga positiva, interactúa con las cargas negativas membranales y causa un choque osmótico que libera a los microorganismos que estarán entonces libres para su identificación.

De los resultados obtenidos el microorganismo más frecuentemente aislado es *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN), el cual se considera como agente contaminante o no patógeno, lo que coincide con lo reportado por otros autores, tales como Montejo en 2002.

Sin embargo Fariña en 2013 menciona que “*Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) se encuentra entre los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología. Sin embargo, su significado clínico en muchas situaciones es difícil de establecer, pues pueden ser comensales inofensivos o patógenos invasores. El protagonismo de este grupo de bacterias como patógeno ha ido en aumento y se les ha asociado con el progreso de la tecnología médica. Han sido reportados como agentes etiológicos de bacteriemias relacionadas a catéteres.”

“La virulencia está fundamentalmente relacionada con la capacidad de ciertas cepas de expresar adhesinas y formar biopelículas (slime) en los dispositivos protésicos y catéteres. Además los SCN pueden sintetizar enzimas como lipasas, ADNasas, termonucleasas, hemolisinas y demás exo-enzimas que degradan los tejidos y contribuyen a la persistencia de la infección.” (Fariña 2013).

Además Sabatier en 2009 reporta que los *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) representan a una infección verdadera en el 15% de los casos.

Seguidos a estos microorganismos de este grupo se encontraron otras especies tales como *Micrococcus luteus/lylae*, *Sphingomonas paucimobilis* que también son considerados como agentes contaminantes o sin relevancia clínica (Po-Hen 1998, Montejo 2002). Estos resultados dan a entender que la toma de muestra, es decir, la fase pre-analítica está siendo deficiente por parte del personal encargado que en su mayoría son médicos, lo cual conllevaría a sugerir capacitación para reducir este tipo de incidencias.

Otro punto a analizar es la frecuencia en los servicios, siendo el más común la Unidad de cuidados intensivos (UCI), lo cual es consistente considerando que hasta el 50% de los episodios de bacteriemia se dan en este servicio, con unas tasas que se sitúan entre 2 y 24 veces las tasas de los pacientes del resto del hospital (Arias, 2003), además Sabatier menciona que “Las bacteriemias representan entre el 25 y el 30% de las infecciones nosocomiales en la UCI, de las cuales el 70% son bacteriemias relacionadas con catéteres intravenosos”.

Los factores que influyen en esta diferencia son el case-mix de la UCI, la frecuencia de uso de dispositivos invasivos y la duración de la estancia en la unidad (Arias, 2003), seguido de Hematología en el cual influyen los mismos factores de la UCI, sin embargo sin tanta complejidad.

A pesar de que ya se cuentan con sistemas lógicos automatizados por ejemplo Bactec 9240 (BD), Isolator® (Oxoid), entre otros. Esta metodología es muy útil para laboratorios con bajos recursos y presenta buenos resultados incluyendo la recuperación de algunas levaduras.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron los hemocultivos y líquidos diversos que cumplieron los criterios de inclusión establecidos.
- Se logró la recuperación de microorganismos mediante la lisis celular con NH_4Cl como agente lisante.
- Se indujo el crecimiento de los microorganismos con ayuda de un medio enriquecido, como lo es el medio BHI.
- Se identificaron con el equipo “Vitek 2” los microorganismos aislados de los hemocultivos reportados como negativos.

CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS

Crear mayor conciencia en la importancia en la fase pre analítica, particularmente en el personal médico, ya que son los que toman las muestras y así poder reducir la incidencia de microorganismos considerados como agentes contaminantes. En cuanto a la situación de tantos SCN se hace la recomendación de darle seguimiento con otras técnicas como procedimientos moleculares tales como secuenciación masiva para determinar la verdadera virulencia de estas cepas.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

Arias, S. (2003). Utilización y rendimiento de los hemocultivos en una unidad de cuidados intensivos medicoquirúrgica. *Revista Medicina Intensiva*. 27, 647-652.

BioMérieux (2006). Vitek 2. [En línea]. Consultado el 21 de Agosto del 2016. Recuperado de: <http://www.diagnosticainternacional.com.mx/admi/tablas/productos/VitekCompact.pdf>

Cisneros, J. (2003). Acinetobacter baumannii: un patógeno nosocomial de difícil control. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21: 221-223.

Fariña, N. (2013). Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*. 30, 480-488.

Forbes, B. (2009). Diagnostico Microbiológico. (12^a ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.

García, P., Fernández, M. (1997). Microbiología Clínica Aplicada. España: Díaz de Santos.

García, P. & Pérez, C. (s.f). Hemocultivos. [En línea]. Consultado el 7 de Agosto del 2016. Recuperado de: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/proc_emo.pdf

González, F. (2012). Protocolo: Obtención de muestra de hemocultivo. [En Línea] Consultado el 07 de Agosto del 2016. Recuperado de: <http://www.sanatorioallende.com/FILES/Archivos/docs/5-%20Protocolo%20-%20Obtenci%C3%B3n%20de%20Muestras%20de%20Hemocultivo.pdf>

Granados, R. & Vilaverde, C. (2003). Microbiología. España: Paraninfo.

Hurtado, M. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 22: 112-118.

Iguchi, A., Thomson, N., Ogura, Y., Saunders, D., Henderson, I., & Harris, D. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology*, 1: 347-54.

Koneman, E. (2008). Diagnostico Microbiológico: Texto Y Atlas En Color. Buenos Aires: Médica Panamericana.

López, J. (2009). Klebsiella pneumoniae: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Revista Iatreia*, 23: 157-165

López, K. (2013). Prevalencia de Positividad de Hemocultivos y Frecuencia de Microorganismos Aislados en el Hospital Pediátrico de Sinaloa de Febrero del 2012 a Febrero del 2013. Licenciatura. Universidad Autónoma De Sinaloa.

Loza, E. (2003). Hemocultivos. [En línea] Consultado el 05 de Agosto del 2016. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia>.

Luján, D. (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 48: 465-474.

Montejo, M. (2002). Bacteriemia y fungemia nosocomial en adultos en un hospital terciario: Estudio de un año. *Revista Gaceta Médica de Bilbao*. 99, 101-102.

Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. Colombia: Universidad de Antioquia.

Ochoa, A. (2013). Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 70: 138-50.

Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 555-567.

Pemán, J., Martín, E., & Rubio, M. (2007). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. España: Revista Iberoamericana de Micología.

Prats, G. (2005). Microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.

Po-Ren, H. (1998) Nosocomial Infections Caused by Sphingomonas paucimobilis: Clinical Features and Microbiological Characteristics. *National Taiwan University Hospital*, 7: 676-681.

Rodríguez, F. (2012). Positive blood cultures in a pediatric emergency department: a descriptive analysis. *Emergencias*. 24: 386-388.

Rodríguez, R., (2012). Manual de neonatología. México: Mc Graw Hill.

Ross, P. (2012). Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular (6^a ed.). Buenos Aires: Panamericana

Sabatier, C. (2009). Bacteriemia en el paciente crítico. *Revista Medicina Intensiva*. 33, 336-345.

Sánchez, R. (2010). Frecuencia de microorganismos aislados de hemocultivos en un hospital de tercer nivel en el estado de Chiapas. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 30, 53-58.

Sirijan, S. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016: 208-216.

Strasinger, S. (2008). Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. (5^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Thermo Fisher Scientific Inc (2011). Sistema automatizado de detección microbiana Thermo Scientific VersaTREK. [En línea]. Consultado el 20 de Agosto del 2016. Recuperado de: <https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/SDG/MBD/MBD%20Documents/Catalogs%20&%20Brochures/Microbiology/Clinical/culturesystems/VersaTREK-Brochure-ES.pdf>

Tortora, G. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Villar, M. (2014). Epidemiologic and Clinical Impact of Acinetobacter baumannii Colonization and Infection. *Medicina*. 95: 202-210.

Zuñiga, A. (2010). Relación entre virulencia y resistencia antimicrobiana en Acinetobacter baumannii. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 14: 148-162.