

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editor: **Juan J. Picazo**

3.

Hemocultivos

1 9 9 3

Coordinador: **José Romero Vivas**

Emilio Bouza Santiago
Elena Loza Fernández de Bobadilla
Ana Planes Reig
Adelaido Rodríguez Cobacho

INDICE

INTRODUCCION
CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BACTERIEMIAS.
ETIOLOGIA DE LAS BACTERIEMIAS.
DIAGNOSTICO DE LAS BACTERIEMIAS.

OBJETIVOS.

TECNICAS DEL HEMOCULTIVO.

INDICACIONES.

METODOS.

EXTRACCION.

PROCEDIMIENTO.

- 1.Recepción de frascos de hemocultivos en el laboratorio.
- 2.Ventilación de los frascos aerobios.
- 3.Temperatura y período de incubación.
- 4.Procesamiento inicial.
- 5.Inspección y procesamiento diario.
- 6.Procesamiento de los hemocultivos positivos.

INFORMACION DE LOS RESULTADOS.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

SISTEMAS AUTOMATICOS DE LECTURA.

CASOS ESPECIALES.

METODOS CUANTITATIVOS.

MICROORGANISMOS ESPECIALES.

Micobacterias

Leptospiras.

Leishmanias.

PACIENTES CON INFECCION POR VIH.

ESTADISTICA.

CONTROL DE CALIDAD.

RECOMENDACIONES.

BIBLIOGRAFIA

3. HEMOCULTIVOS 1993

INTRODUCCION

Definimos como bacteriemia la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos. La bacteriemia es una complicación grave de las infecciones bacterianas, con importantes implicaciones pronósticas, que se presenta en general en pacientes hospitalizados.

El término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre, de forma análoga a como hemos definido bacteriemia. La mayoría de las fungemias son causadas por levaduras como *Candida* y *Criptococcus* y tienen las mismas implicaciones y metodología diagnóstica que las bacteriemias por lo que las describiremos de forma conjunta.

Septicemia o sepsis son expresiones que se emplean a menudo para denominar el síndrome clínico con el que se manifiestan las bacteriemias, independientemente del resultado de los hemocultivos. Por ello, resulta bastante confuso y preferimos no utilizarlo en esta revisión.

La bacteriemia y la fungemia se producen cuando la multiplicación y llegada de microorganismos a la sangre supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. La invasión del torrente sanguíneo se produce desde un foco de infección extravascular, a través de los capilares o de las vías linfáticas, o desde un foco intravascular como en la endocarditis.

La diferenciación entre bacteriemias continuas como aquellas en que los microorganismos están llegando constantemente a la sangre y bacteriemias intermitentes, en las que se encuentran en la sangre de forma discontinua, es difícil de establecer y no tiene interés en la práctica.

La bacteriemia y la fungemia tienen implicaciones pronósticas importantes ya que se asocian a una elevada mortalidad que oscila entre el 20 y 40%. El descenso de ésta se encuentra claramente relacionado con la administración de un tratamiento antibiótico adecuado lo más precozmente posible. Por ello, el aislamiento de un microorganismo en los hemocultivos es trascendente porque establece el diagnóstico etiológico de la bacteriemia y permite conocer la sensibilidad del microorganismo causal a los antimicrobianos.

La aplicación de una buena metodología para la extracción y procesamiento de los hemocultivos debe perseguir: 1. - El

aislamiento de todos los microorganismos productores de bacteriemia. Para ello deben tenerse en cuenta sus diferentes requerimientos nutricionales, temperatura y atmósfera de óptimo crecimiento y período de incubación. 2.- La detección precoz de la presencia de bacterias en sangre de forma que las modificaciones del tratamiento que ello conlleva se puedan realizar con la mayor rapidez. 3.- La diferenciación, en la medida de lo posible, de los casos de verdadera bacteriemia de aquellos en los que la positividad se debe a un inadecuado procedimiento de extracción y procesamiento de la muestra. 4.- La identificación precisa de los agentes causales de la bacteriemia y su sensibilidad a los antimicrobianos.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BACTERIEMIAS.

La incidencia de la bacteriemia depende de la población estudiada y oscila entre 5 y 30 casos por cada 1000 pacientes hospitalizados. Se presenta a cualquier edad y están especialmente predisuestos a padecerla los pacientes con graves enfermedades de base y los sometidos a maniobras que causan alteraciones de los mecanismos generales y locales de defensa frente a la infección.

La bacteriemia puede ser una complicación de infecciones localizadas como infección urinaria, infecciones respiratorias, etc., puede deberse a la irrupción directa de los microorganismos en el torrente cardiovascular como en el caso de pacientes adictos a drogas, portadores de catéteres intravasculares y sometidos a cirugía cardíaca, o bien la puerta de entrada puede ser inaparente.

Las manifestaciones clínicas de las bacteriemias son muy variadas y van desde un cuadro febril, sin ninguna otra manifestación clínica, hasta el shock séptico con fracaso multiorgánico.

ETIOLOGIA DE LAS BACTERIEMIAS.

La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente sanguíneo. La distribución de los agentes causales de la bacteriemia y la fungemia ha variado en los últimos años y actualmente los microorganismos Gram positivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los bacilos Gram negativos.

Los motivos de este cambio no se han establecido con exactitud, pero se atribuyen

a la utilización de antibióticos de amplio espectro, al uso generalizado de catéteres intravasculares, a la mayor supervivencia de enfermos graves, a la aparición de resistencia a los antimicrobianos en microorganismos como *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus* que pueden causar brotes de infección hospitalaria, a la mayor agresividad de la cirugía y a la utilización de maniobras terapéuticas invasivas. Por otra parte, el aumento de pacientes con neoplasias o infección por VIH, gravemente inmunodeprimidos, ha provocado la aparición cada vez más frecuente de bacteriemias causadas por agentes que en el pasado eran causa muy rara de infección (*Corynebacterium*,...)

DIAGNOSTICO DE LAS BACTERIEMIAS.

El diagnóstico definitivo de la bacteriemia se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre, mediante el cultivo de ésta.

Además, la necesidad de realizar hemocultivos deriva de los siguientes hechos: 1.- El aislamiento de una bacteria en los hemocultivos aporta una valiosa información a la hora de elegir el tratamiento antimicrobiano adecuado. 2.- El hemocultivo no es una técnica costosa y su obtención no conlleva ningún riesgo para el paciente. 3.- Las características clínicas de la bacteriemia y las situaciones en que puede presentarse son tan variadas que no permiten establecer un diagnóstico clínico con suficiente certeza.

Todo ello obliga a mantener un alto índice de sospecha y extraer hemocultivos a muchos de los pacientes que ingresan en el hospital o que consultan por sospecha de infección. Existen dos datos que ilustran este hecho, por una parte, en el 14-25% de los pacientes hospitalizados se sospecha bacteriemia y se les extraen hemocultivos y por otra, en aproximadamente el 14% de los casos en los que se obtienen hemocultivos se establece el diagnóstico de bacteriemia.

OBJETIVOS

El hemocultivo tiene una importancia capital no solo porque establece con certeza el diagnóstico etiológico, sino también porque la identificación del microorganismo causal y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos permite elegir el tratamiento más eficaz. Por ello, el diagnóstico de las bacteriemias, con un adecuado procesamiento de los hemocultivos, debe

ser una de las funciones más importantes del Laboratorio de Microbiología Clínica.

En este documento se desarrollan las normas generales para el estudio microbiológico de las bacteriemias con el fin de que pueda servir de guía para el procesamiento de los hemocultivos en el Laboratorio de Microbiología y persigue los siguientes objetivos:

- 1.- Describir las normas de recogida de muestras de sangre para hemocultivos.
- 2.- Establecer el volumen de sangre, número de hemocultivos y medios de cultivo a utilizar.
- 3.- Definir la metodología para su procesamiento.
- 4.- Establecer una guía de interpretación adecuada de los resultados para que éstos proporcionen una información lo más rápida y útil posible.

TECNICAS DE HEMOCULTIVO

INDICACIONES.

Es imposible detallar todas las situaciones en que se deben extraer hemocultivos, pero de una forma general las indicaciones más importantes son:

1.- Fiebre alta, especialmente si se acompaña de afectación grave del estado general para la que no existe una causa clara que lo explique y especialmente si se asocia con fracaso de órgano como distress, hígado de sepsis, etc. La información que aportan los hemocultivos es singularmente valiosa en pacientes en los que se sospecha endocarditis, con alteraciones valvulares o fenómenos periféricos característicos de esta entidad, y en neutropénicos que presentan fiebre.

Existen pacientes en los que la bacteriemia puede cursar sin fiebre como es el caso de los neonatos o de pacientes ancianos, en los que esta se acompaña de deterioro de su situación general y, en ocasiones, de hipotermia.

2.- Estado de shock no explicado por causas hemodinámicas.

3.- Infecciones localizadas que pueden complicarse con bacteriemia como neumonía, pielonefritis, meningitis, infecciones intraabdominales, infecciones graves de la piel o tejido celular subcutáneo, etc.

4.- La presencia de leucopenia, leucocitosis o trombopenia no relacionada con procesos hematológicos.

MÉTODOS.

Los métodos para el estudio microbiológico de los hemocultivos pueden ser

cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos.

Los cuantitativos permiten establecer el número de bacterias por ml. de sangre cultivada. La técnica que se sigue es la descrita por Schotmüller y consiste en preparar placas de agar sangre mediante la mezcla de una muestra de sangre obtenida del paciente y agar nutriente. Este procedimiento es engorroso, necesita personal experto en la preparación del medio, que pueda realizarlo en el momento en que se sospecha la bacteriemia y se extraiga la sangre y no es válido para el aislamiento de bacterias anaerobias. Todo ello hace imposible el empleo rutinario de esta técnica en los laboratorios que reciben un elevado número de hemocultivos, por lo que se reserva al estudio de casos especiales en los que sea importante determinar el número de bacterias por ml. de sangre, como en las sepsis asociadas a catéter.

En los métodos semicuantitativos se sigue un procedimiento de lisis centrifugación. Para ello, se realiza la extracción de sangre en un tubo "sistema vacutainer" con saponinas que rompen las células sanguíneas. La sangre se centrifuga y el sedimento se siembra directamente en las placas de cultivo. Este método permite una valoración semicuantitativa por recuento de las colonias aisladas, consigue a menudo una identificación más rápida de los microorganismos causales y facilita la búsqueda de bacterias como micobacterias o *Legionella* al permitir seleccionar los medios de cultivo más adecuados para aislar dichos microorganismos. Tiene el inconveniente de que la manipulación de la muestra aumenta la posibilidad de contaminación y requiere un procesamiento individualizado con la consiguiente necesidad de personal de laboratorio.

Los métodos cualitativos se realizan cultivando la sangre en frascos con medio líquido o bifásico y son los utilizados de forma rutinaria en la mayoría de los Laboratorios de Microbiología. En éstos el medio de cultivo debe examinarse diariamente para detectar lo antes posible los signos de crecimiento bacteriano. En el procedimiento convencional este examen diario se realiza por inspección visual de los frascos y es el que describiremos en primer lugar en este documento. Existen otros procedimientos de lectura basados en la producción de CO₂ que facilitan aparatos automáticos. Estos se han ido incorporando a los Laboratorios de Microbiología por que

detectan con rapidez el crecimiento bacteriano y facilitan el trabajo del personal de laboratorio.

EXTRACCION.

Las muestras de sangre para hemocultivos deben obtenerse por venopunción. El momento más adecuado para extraerlas debe coincidir con aquel en el que existe un mayor número de bacterias en sangre, lo que procede a la aparición de la fiebre. En muchos de nuestros hospitales la extracción se realiza cuando la temperatura aumenta por encima de 38,5°C.

La contaminación de los hemocultivos por microorganismos de la flora cutánea durante la extracción se evitará, en la medida de lo posible, con la adecuada preparación de la piel mediante una antisepsia adecuada. El procedimiento de extracción es diferente según los hospitales; mientras en algunos es responsabilidad de un equipo único, en otros depende del personal de enfermería encargado de la asistencia del paciente. El microbiólogo vigilará el adecuado cumplimiento de las normas de extracción y realizará una labor de formación del personal encargado de esta tarea.

1.- Elección del punto de venopunción y asepsia de la piel.

Antes de la extracción de cada hemocultivo se preparará el material necesario. Se utilizará una bandeja que contenga: antiséptico yodado (povidona, yodo u otro yodóforo), alcohol isopropílico al 70%, jeringas de 20 ml., agujas para venopunción, gasas y guantes estériles, esparadrapo, compresor de goma y frascos para hemocultivos aerobios y anaerobios.

Cada una de las muestras de sangre se obtendrá de venopunciones diferentes y los puntos se seleccionarán previamente. Las venas del antebrazo son las que se utilizan generalmente para este fin. La extracción de la sangre no debe realizarse a través de catéter, salvo en los casos de sospecha de sepsis asociada a éste como se describirá en el apartado de casos especiales.

La sangre arterial se ha recomendado para el diagnóstico de las endocarditis por hongos, pero no se han comprobado sus ventajas sobre la sangre extraída por venopunción.

Se limpiará rigurosamente el punto elegido de la piel con alcohol isopropílico o etílico al 70% y posteriormente se extenderá sobre el mismo tintura de yodo al 1 ó 2% durante 30 segundos o povidona yodada durante 1 minuto. Es importante esperar a que el compuesto yodado se seque para que

ejerza su acción oxidante y evitar tocar con los dedos el lugar de la venopunción, así como hablar o toser mientras se realiza la extracción. En pacientes alérgicos al yodo, la piel se limpiará dos veces con alcohol.

Antes de realizar la extracción se limpiarán con un antiséptico los tapones de los frascos de hemocultivo.

2.- Extracción de la sangre.

Se inserta la aguja en la vena elegida para extraer el volumen de sangre determinado (ver apartado volumen). Una vez terminado el procedimiento se quitará el compresor y se retirará la jeringa con la aguja de la vena. No poner algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de sacarla de la vena. Se inoculan los frascos rápidamente, para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesándolos con la aguja en posición vertical. No es necesario cambiar la aguja para hacerlo. Es conveniente recordar que el vacío que incorporan los frascos succiona rápidamente el contenido de la jeringa. Se inocula en primer lugar el frasco anaerobio evitando la entrada de aire. Si la vena se pierde durante la extracción, utilizar un nuevo equipo de aguja y jeringa. Retirar los restos de yodo de la piel y cubrir con una gasa estéril.

La extracción de sangre se hará sin anticoagulante, excepto en los hemocultivos cuantitativos que se describirán en el apartado correspondiente.

3.- Dilución y volumen de la sangre.

La dilución de la sangre es necesaria con el fin de neutralizar las propiedades bactericidas de ésta y el posible tratamiento antimicrobiano del paciente. Se recomienda una dilución 1/10. Diluciones superiores no son aconsejables aunque pueden ser aceptadas, sobre todo en el caso de los niños. El volumen de sangre a cultivar admitido en general para adultos es de 10 ml por extracción, aunque algunos autores recomiendan 20 ó 30 ml. En niños, especialmente recién nacidos y prematuros, de 1 a 5 ml.

4.- Número de hemocultivos y medios de cultivo.

Es aconsejable extraer la sangre antes de comenzar el tratamiento antimicrobiano. Se recomienda obtener 2 ó 3 muestras en 24 horas con un intervalo entre ellas superior a una hora. Sin embargo, generalmente se aceptan dos o tres extracciones separadas 30 minutos cada 24 horas. En casos de extrema urgencia como meningitis, shock séptico, etc. el intervalo puede reducirse. Los 10 ml. de sangre de cada extracción se

repartirán a partes iguales en dos frascos con tapón de goma con medios de cultivo aerobio y anaerobio.

Existen numerosos tipos de frascos de hemocultivo, además de los referidos para el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios. Destacan entre ellos los optimizados para pequeños volúmenes de sangre, útiles en pediatría, los medios con resinas que neutralizan los antibióticos que recibe el paciente, los selectivos para hongos, etc. que pueden ser utilizados en casos específicos.

5.- Etiquetado de los frascos y transporte.

Los frascos se marcarán con una etiqueta en la que conste el nombre del paciente, el número de la cama y la hora de la extracción para identificar correctamente las parejas de frascos de cada una de las extracciones.

Cada extracción se acompañará de un volante en el que consten, al menos, los siguientes datos: nombre y dos apellidos del paciente, fecha y hora de extracción, servicio de procedencia, número de cama, nombre del médico que realiza la petición, diagnóstico del paciente y tratamiento antibiótico previo.

Los hemocultivos se enviarán inmediatamente al Laboratorio de Microbiología. Si no es posible, se incubarán en estufa a 35-37°C. Si no se dispone de ésta, se dejarán a temperatura ambiente, nunca en nevera.

PROCEDIMIENTO.

En primer lugar, es necesario recordar que la sangre inoculada en los frascos puede contener microorganismos viables, incluidos el virus de la hepatitis o el VIH, lo que implica un riesgo de infección para las personas que los manipulan. En este sentido, existen en todos los hospitales normas de prevención en el manejo de sangre que deben ser seguidas de forma estricta y que muy someramente se podrían resumir en la utilización de guantes, batas, mascarillas desechables, campanas protectoras y en la no reinsertión de las agujas en su capuchón original, arrojándolas a los envases preparados a tal efecto.

1.- Recepción de los hemocultivos en el laboratorio.

Los frascos de hemocultivo se enviarán al laboratorio acompañados del volante con los datos descritos. A su llegada, se comprobará la coincidencia de ambos. También es conveniente verificar la hora de extracción ya que los hemocultivos pueden

haber estado incubados el tiempo suficiente para detectar crecimiento.

En muchos de nuestros hospitales los hemocultivos extraídos durante la tarde y la noche se conservan en estufa hasta la mañana siguiente en que se reciben en el laboratorio. Se registrarán los datos del paciente y se numerarán los hemocultivos de acuerdo con las normas de cada laboratorio. Debe realizarse una hoja de trabajo para cada uno de los hemocultivos.

2.- Ventilación de los frascos aerobios.

Los medios comerciales permiten el crecimiento de la mayoría de las bacterias y están provistos de vacío. En el caso de ciertos microorganismos aerobios como *Pseudomonas*, hongos, .. el crecimiento se acelera con la incubación en atmósfera aerobia. Por ello, se deben ventilar los frascos aerobios a su llegada al laboratorio para crear la atmósfera que facilite su crecimiento.

La ventilación se hará en condiciones de esterilidad. Para ello se desinfectará el tapón del frasco con alcohol y posteriormente se introducirá una aguja estéril acoplada a una caperuza especialmente diseñada para la ventilación de los frascos. No olvidar que, en caso de existir crecimiento bacteriano, el aumento de la presión en el interior del frasco puede provocar que el líquido se proyecte al exterior con riesgo de contaminación para la persona que lo está procesando.

3.- Temperatura y período de incubación.

La mayoría de los microorganismos que causan bacteriemia se detectan en los primeros 2 ó 3 días de incubación. Por ello, se recomienda incubar los hemocultivos durante un período de 5 a 7 días. La temperatura óptima de incubación es de 35 a 37°C.

Existen algunos microorganismos que necesitan un período de incubación más largo, como *Brucella* y bacterias de difícil crecimiento que causan endocarditis, como *Haemophilus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*... También los hongos necesitan, cuando se sospecha la existencia de estos patógenos, la rutina más extendida es la de prolongar la incubación de los hemocultivos hasta 4 semanas.

Los pacientes con infección por VIH pueden desarrollar bacteriemia por microorganismos con requerimientos especiales para su aislamiento, en cuyo caso se deben introducir algunas variaciones en este procedimiento que serán desarrollados en el apartado de casos especiales.

4.- Procesamiento inicial.

Los frascos aerobios y anaerobios de hemocultivos deben ser examinados diariamente durante el período que se mantengan en incubación. Para ello, se extraerán de la estufa con cuidado de no agitarlos para mantener el sedimento en el fondo con objeto de poder examinar el grado de turbidez del caldo. La inspección debe realizarse con buena iluminación, de forma ordenada y anotando el resultado en las hojas de trabajo.

En la inspección visual, los signos macroscópicos que indican crecimiento bacteriano son la turbidez del caldo, la presencia de colonias bacterianas, la aparición de hemólisis o la producción de gas. En los medios bifásicos se buscarán colonias en la fase sólida.

La primera inspección se realizará tras 18-24 horas de incubación. Los frascos con signos macroscópicos de crecimiento se separarán para su procesamiento ulterior (apartado 5).

En los hemocultivos sin estos signos, con el fin de detectar lo antes posible la presencia de bacterias, se puede realizar una tinción con naranja de acridina o un subcultivo ciego en medios sólidos.

a.- **Naranja de acridina.** La tinción con naranja de acridina permite la visualización de bacterias mediante el examen de la muestra teñida en el microscopio de fluorescencia. Esta técnica es sencilla de realizar, proporciona una información rápida y se correlaciona con el aislamiento de bacterias en los subcultivos con una elevada sensibilidad y especificidad.

La tinción con naranja de acridina se realizará de una muestra de los frascos aerobios de cada una de las parejas de hemocultivos sin signos macroscópicos de crecimiento bacteriano.

La sangre de los frascos se obtendrá con jeringa y aguja según el siguiente procedimiento: después de limpiar los tapones de los frascos con alcohol de 70°, atravesar con una aguja, previamente conectada a la jeringa, el tapón del frasco en dirección vertical y aspirar el contenido. Tras ello se depositará una gota de sangre en un porta bien limpio, previamente rotulado con el mismo número que el hemocultivo. El resto del contenido de la jeringa se introducirá en un tubo estéril de 3 a 5 ml., rotulado también con el mismo número, que se cerrará herméticamente con tapón de rosca. La jeringa y la aguja se desecharán en un recipiente de paredes duras para residuos biocontaminados.

Nunca se insertará de nuevo la aguja en el capuchón.

La extensión realizada en la porta se tiñe con naranja de acridina y se examina en el microscopio de fluorescencia. En los casos en los que se visualice algún microorganismo, se realizará tinción de Gram y subcultivo de la muestra conservada en el frasco estéril, como se describe en el apartado 6 (Procesamiento de los hemocultivos positivos).

b. - **Subcultivo ciego.** En los casos en que no se realice la tinción con naranja de acridina se hará un subcultivo ciego tras las primeras 18-24 horas de incubación. Para ello, se extraerá una muestra de los frascos de hemocultivos como se ha descrito en el apartado anterior y se sembrará en agar chocolate que se incubará a 35-37°C, en atmósfera con 5-10% de CO² durante 72 horas. También se puede sembrar en una placa de agar sangre que se incubará en aerobiosis. Las placas se examinarán diariamente para detectar lo antes posible el crecimiento de bacterias. Algunos autores siembran una estría de *Staphylococcus* hemolítico en la placa de agar sangre para favorecer el crecimiento de colonias satélites. No es necesario sembrar en anaerobiosis el subcultivo de 24 horas.

El subcultivo ciego retrasa la información inicial respecto al naranja de acridina, pero permite obtener colonias aisladas en 24-72 horas por lo que el resultado definitivo no se demora. Esta técnica implica sembrar placas de todos los hemocultivos, lo que supone trabajo y aumento del coste.

5.- Inspección y procesamiento diario.

Los frascos de hemocultivos aerobios y anaerobios se examinarán, mediante inspección visual, diariamente durante los 5-7 días que permanecen de forma ordenada, siguiendo el número de registro y se anotarán los resultados en la hoja de trabajo.

Subcultivo de salida. Los hemocultivos que durante el período de incubación de 5-7 días no tengan signos de crecimiento bacteriano, se subcultivarán en medios sólidos de la misma manera descrita para el subcultivo ciego. Si no se obtiene crecimiento, se desecharán los frascos y las placas y los hemocultivos serán informados como estériles a los 5-7 días de incubación.

En casos de sospecha de bacteriemia por microorganismos de difícil crecimiento, tras estos primeros 5-7 días, se prolongará la incubación hasta completar 4 semanas. Durante dicho período, los frascos serán examinados mediante inspección visual 1 ó

2 veces por semana. Si no se observan signos de crecimiento se les realizará un subcultivo de salida al final del mencionado período de incubación y, si éste es negativo, se informarán como estériles a las 4 semanas de incubación y se desecharán definitivamente.

6.- Procedimientos de los hemocultivos positivos.

Los hemocultivos con signos de crecimiento bacteriano y aquellos en los que la tinción de naranja de acridina revele la presencia de microorganismos se procesarán para obtener la información más rápida y exacta posible sobre su identidad y sensibilidad a los antimicrobianos.

En primer lugar se extraerá una muestra de todos los frascos con signos de crecimiento mediante jeringa y aguja siguiendo el procedimiento y las precauciones recogidas en el apartado de procesamiento inicial. De dicha muestra se realizará una extensión en un porta bien limpio, previamente rotulado con el número del hemocultivo, para efectuar una tinción de Gram y un subcultivo, independientemente del resultado del examen del Gram, en agar sangre, agar chocolate y agar sangre enriquecido que se incubarán en aerobios, 5-10% de CO² y anaerobios, respectivamente. El resto de la muestra de rosca se guardará en un tubo estéril con tapón de rosca previamente rotulado.

Las extensiones teñidas mediante la técnica de Gram se examinarán al microscopio óptico con 1.000 aumentos. El resultado de dicho examen se anotará en la hoja de trabajo, detallando todos aquellos datos que puedan ser de utilidad para determinar con la mayor fiabilidad posible la identificación presuntiva del microorganismo causal. Los siguientes ejemplos recogen la mayoría de los casos: A. Cocos Gram positivos en racimos, B. Cocos Gram positivos en parejas o cadenas. C. Cocos Gram negativos en parejas o cadenas. D. Bacilos o cocobacilos Gram negativos, E. Bacilos Gram positivos tipo *Bacillus* o *Corynebacterium*, F. Formas ramificadas, G. Levaduras, H. Tinción irregular, I. Pleomorfismo y J. Más de un tipo de microorganismo, como cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos.

Las muestras en las que se haya visualizado algún microorganismo en la tinción de Gram se sembrarán ulteriormente del tubo estéril en los medios adecuados según la información obtenida y se procesarán para obtener la identificación del

microorganismo y su sensibilidad a los antimicrobianos (ver esquema).

INFORMACION DE LOS RESULTADOS.

La información de los resultados, preliminares o definitivos, se realizará con la mayor rapidez posible ya que de ella derivarán posiblemente cambios en el tratamiento que pueden ser vitales para el pronóstico del paciente. En primer lugar, se debe poder disponer del resultado del examen diario de cada hemocultivo. En segundo lugar, el resultado de la tinción de Gram se informará telefónicamente a los médicos que asisten al paciente y, si es posible, también por escrito. En tercer lugar, la identificación definitiva de los microorganismos aislados y el resultado de su sensibilidad a los antibióticos se enviará por escrito por los cauces más rápidos.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

La interpretación óptima de los resultados de los hemocultivos requiere en general el conocimiento de la situación clínica del paciente, su enfermedad de base, los factores predisponentes a la infección y los tratamientos antimicrobianos que le han sido administrados. Ello obliga, en colaboración con el médico responsable de la atención clínica de dichos pacientes, a revisar la historia clínica, los hallazgos de la exploración física y los resultados de los exámenes complementarios realizados. En ausencia de estas referencias clínicas, la interpretación de los resultados por parte del microbiólogo puede estar sujeta a errores, pero hay datos que pueden ayudarle como la identidad del microorganismo y el número de frascos de los que se ha recuperado. Por ejemplo, la presencia de un *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* o *Bacillus* en un solo frasco de una serie de tres hemocultivos supone a menudo la existencia de contaminación.

SISTEMAS AUTOMATICOS DE LECTURA.

En los últimos diez años se han desarrollado diferentes sistemas automáticos para la lectura de los hemocultivos con el fin de aumentar la sensibilidad y la rapidez en la detección del crecimiento bacteriano y agilizar el trabajo del personal encargado. Estos sistemas se basan en la detección del CO₂ que se produce en el crecimiento bacteriano por diferentes métodos, radiométricos,

fluorimétricos, espectrometría de infrarrojos, cambios del pH, etc.

BACTEC fue el sistema automático inicialmente introducido que ha sido utilizado en muchos Laboratorios de Microbiología de centros hospitalarios. Su primer procedimiento de lectura fue el radiométrico, que utilizaba un sustrato marcado con carbono radioactivo (C14) que al ser metabolizado por las bacterias liberaba CO₂ marcado la medio. Su principal inconveniente era la eliminación de residuos radiactivos y ha quedado relegado para el cultivo de ciertos microorganismos como micobacterias. Actualmente, el sistema BACTEC detecta la presencia de CO₂ por un procedimiento de infrarrojos. Existe diferentes versiones de este sistema. La más conocida, BACTEC NR 660, consta de un ordenador que almacena los resultados, una estufa con un agitador y un módulo de lectura conectado a dos bombonas con una mezcla fija de gases previamente determinada por el fabricante. Este método detecta los niveles de CO₂ producidos por las bacterias en los frascos con medio líquido y los expresa como un índice de crecimiento al compararlos con los niveles de CO₂ en frascos de control. En general, un índice de crecimiento superior a 30 o un valor diferencial entre dos lecturas consecutivas superior a 15 es considerado como positivo. Estos parámetros pueden ser modificados por el usuario para conseguir una sensibilidad y especificidad óptimas. Este sistema utiliza un agitador para los frascos aerobios durante las primeras 24-48 horas, lo que aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

La lectura de los hemocultivos con el sistema BACTEC está totalmente automatizada. Los datos del paciente, la fecha y el número de frascos se introducen en el ordenador, que asigna a cada uno una posición en bandejas especiales. Los frascos que inicialmente tienen claros signos de crecimiento se separan y el resto se colocan en la posición marcada.

Las bandejas con los frascos se depositan en el módulo de lectura, que permanecerá cerrado durante todo el proceso, y ésta es realizada por un cabezal móvil provisto de dos agujas que perforan los tapones de goma. Cada frasco es analizado por separado y es pinchado por dos agujas: una extrae el gas para examinar el nivel de CO₂ y la otra inyecta una mezcla de gases para mantener una atmósfera, aerobia o anaerobia, determinada. El ambiente dentro del módulo de lectura se mantiene estéril

con una lámpara de rayos ultravioleta y las agujas se esterilizarán después de cada extracción mediante el calor de una resistencia incandescente. Los primeros tres días se recomiendan dos lecturas diarias de los frascos aerobios para acortar el tiempo de positivización.

El ordenador almacena los resultados de la lectura diaria de los hemocultivos durante todos los días que permanecen en incubación. Cuando existe un índice de crecimiento superior a los niveles establecidos, el sistema informa ese frasco como positivo. Estos se recogen de la bandeja y se procesan mediante tinción de Gram y subcultivo de forma análoga a la descrita en el apartado anterior.

Existen un 2% de falsos positivos, en los que se encuentra un índice de crecimiento elevado y no se consigue aislar ningún microorganismo. Se ha atribuido a la actividad de las células hemáticas y se ha descrito en el caso de pacientes con leucemias agudas. Ante la persistencia de lecturas elevadas se debe descartar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento. Para ello se realizarán tinciones especiales y subcultivos a medios que permitan el aislamiento de dichos microorganismos.

La sensibilidad del sistema BACTEC es elevada y está claramente establecido que no es necesario realizar subcultivos o tinción con naranja de acridina durante las primeras 24 horas ni antes de desechar los frascos, tras 5-7 días de incubación. Ello supone ahorro de personal y disminución del riesgo de contaminación debida a la manipulación de los frascos. Además, permite consultar los resultados diariamente mientras dura la incubación. Este sistema se ha mejorado en una última versión en la que las bandejas son introducidas mecánicamente de forma automática en el módulo de lectura. Sus mayores inconvenientes son su elevado coste, las averías mecánicas y la limitación de la gestión de datos que no admite información externa sobre la identificación de los microorganismos y su sensibilidad a los antimicrobianos y lo convierte en completamente nulo para el análisis estadístico de los resultados.

Otros sistemas automáticos introducidos más recientemente eliminan prácticamente toda manipulación, realizan una monitorización de los frascos continua e ininterrumpida, algunos con agitación constante, y notifican inmediatamente los resultados positivos. Todos utilizan técnicas

no invasivas para la lectura por lo que no se necesitan bombonas de gases.

BACTEC 9240 detecta el CO₂ y las variaciones de pH producidos por el crecimiento de los microorganismos por fluorescencia en fase sólida y VITAL en fase líquida, la llamada H.F.T. (Tecnología fluorescente homogénea), BACT/ALERT por colorimetría, ESP 128 monitorizando las variaciones de la presión y BIOARGOS por espectroscopia infrarroja.

En todos ellos, excepto en el BIOARGOS, existe un detector para cada uno de los frascos que está en la base o en la parte alta del recipiente que aloja a cada uno de ellos. El BIOARGOS, por el contrario, utiliza un solo lector por el que pasan los frascos por medio de un brazo móvil. La sensibilidad y especificidad de estos sistemas en los primeros estudios comparativos parece similar a la del BACTEC tradicional, pero falta aún información para aclarar definitivamente su papel. Es conveniente resaltar el elevado coste de todos estos nuevos sistemas automáticos.

Los siguientes aspectos deben tenerse en cuenta a la hora de decidir el sistema a utilizar para la lectura de los frascos de hemocultivos:

- 1.- Sensibilidad y especificidad.
- 2.- Rapidez de la detección de crecimiento bacteriano.
- 3.- Volumen y composición de los frascos.
- 4.- Capacidad del sistema.
- 5.- Mantenimiento.
- 6.- Ahorro de personal.
- 7.- Coste del sistema, incluido el gasto de las botellas de gases.
- 8.- Flexibilidad en la gestión de datos y versatilidad y sencillez del programa estadístico.

CASOS ESPECIALES.

MÉTODOS CUANTITATIVOS

Cada vez es más frecuente la canalización vascular de los pacientes ya sea con fines terapéuticos y/o diagnósticos y por lo tanto mayor la posibilidad de desarrollar una infección asociada a un catéter. Se estima que la bacteriemia asociada a un catéter se produce entre el 1 y el 8% de las cánulas utilizadas. Por otra parte, el 33% de las bacteriemias nosocomiales tienen este origen.

En los pacientes policateterizados o portadores de catéter central para tratamientos prolongados o hemodiálisis en los que se sospeche que son foco de infección es posible hacer hemocultivos

cuantitativos. Estos se realizarán a partir del catéter y al mismo tiempo por venopunción.

Técnica: Se extraen de 4 a 7 ml. de sangre a través de cada catéter que se quiera estudiar y se introducen en un tubo que contenga anticoagulante, el óptimo es el SPS. Se transportará al laboratorio rápidamente y se realizarán placas por el método de Schotmüller. En cada uno de los tubos se especificará de forma muy clara la procedencia de la extracción. Se procede de la misma manera con la extracción por venopunción y a la vez se realiza un hemocultivo convencional ya que la bacteriemia puede ser de muy bajo grado y no detectarse con el método cuantitativo, o no ser el catéter el foco de la bacteriemia.

Las placas se incuban a 35-37°C durante 5 días con lectura diaria. El procesamiento de los positivos es igual al de la técnica convencional descrita.

Se considera que un catéter es foco de bacteriemia cuando se aísla la misma bacteria en los dos hemocultivos cuantitativos y el número de UFC/ml. aisladas en el del catéter es 4 veces superior al obtenido por venopunción.

MICROORGANISMOS ESPECIALES

Micobacterias

La sangre no es la muestra más adecuada para diagnosticar una micobacteriosis. No obstante, actualmente en pacientes portadores del VIH se ha observado que presentan micobacteriemia con relativa frecuencia, generalmente con muy poca sintomatología o muy inespecífica. En estos casos puede estar indicado investigar la presencia de micobacterias en sangre. Las técnicas más apropiadas para ello son el Sistema Lisis Centrifugación y/o el Sistema BACTEC radiométrico utilizando los medios 12A y 13A. Es posible también hacer una combinación de ambos: procesar la sangre por la técnica de lisis/centrifugación y sembrar después en los viales del BACTEC con el fin de acortar el período de incubación. Recientemente, otros autores recomiendan centrifugar el contenido de los frascos aerobio y anaerobio tras su incubación 5-7 días y sembrar el sedimento obtenido en medios específicos para micobacterias.

Leptospiras

La leptospirosis es una infección aguda producida por espiroquetas del género *Leptospira* que se muestra a menudo con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Generalmente, el microorganismo

está presente en la sangre en la fase aguda, durante la primera semana de la enfermedad.

Cultivo: Se realiza añadiendo de 1 a 3 gotas de sangre fresca del paciente a 5 ml. del medio de Stuart o a los medios semisólidos de Fletcher o Ellinghausen. Previamente a la inoculación de la sangre añadiremos suero fresco de conejo a una concentración del 14%. La incubación se hace en oscuridad, a 30°C durante 28 días. Se examina una vez a la semana en campo oscuro una parte del cultivo para la observación de las formas espiroquetales y su movilidad. El examen directo de la sangre en campo oscuro no es recomendable ya que pueden confundirse restos de hematíes con *Leptospira*.

Ante la sospecha de leptospirosis es aconsejable determinar la presencia de anticuerpos específicos.

Leishmanias

En los países mediterráneos es frecuente la leishmaniasis, parasitosis del sistema mononuclear fagocítico causada por *Leishmania donovani*. Desde la aparición del sida, esta parasitosis ha aumentado en nuestro medio siendo una de las infecciones más frecuentes en este tipo de pacientes. El diagnóstico requiere la demostración de la presencia de *Leishmania* ya sea por examen microscópico, realizando una tinción de Giemsa, a partir de las muestras obtenidas de médula ósea, de una biopsia de bazo de una adenopatía o bien por cultivo.

Cultivo: El medio clásico es el NNN, al cual hay que añadir una tercera parte de su volumen de sangre defibrinada de conejo. Es algo engorroso de preparar y fácil la contaminación del mismo. Otros medios útiles son el medio Drosophila de Schneider al que se añade suero fetal bovino a una concentración del suero fetal bovino a una concentración del 30% o bien MEM (Eagle minimal essential medium) al que también se le adiciona suero fetal bovino. Se inoculan dos o tres gotas de la muestra por tubo de medio preparado y se deja a temperatura ambiente durante 1 mes.

Lectura: Se realiza un examen microscópico del medio de cultivo colocando una gota entre porta y cubreobjeto al tercer día y una vez por semana.

PACIENTES CON INFECCION POR VIH.

Cada vez es mayor el número de pacientes atendidos en los centros hospitalarios

portadores del VIH, un alto porcentaje de los cuales son adictos a drogas por vía parenteral (ADPV) y, al mismo tiempo han aumentado considerablemente los enfermos con sida. Es bien conocido que el estado inmunitario de estos pacientes condiciona una elevada incidencia de infecciones oportunistas, estimándose en este grupo de población un índice de bacteriemia entre el 7,2 y el 30%, cuya etiología más frecuente es *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Además, este tipo de enfermos presentan infecciones oportunistas diseminadas causadas por micobacteria, hongos o parásitos que pueden detectarse mediante hemocultivo. Así, son frecuentes las infecciones diseminadas por *Mycobacterium avium*, *Criptococcus neoformans* y *Leishmania donovani* y en nuestro país, donde la prevalencia de la tuberculosis es elevada, es habitual aislar *Mycobacterium tuberculosis*.

Por lo tanto, es aconsejable notificar siempre al Laboratorio de Microbiología si un paciente es portador de VIH porque puede ser conveniente prolongar el período de incubación de los frascos aerobios o hacer cultivos especiales según la orientación diagnóstica del proceso infeccioso actual.

ESTADISTICA.

Con objeto de conocer en cada medio la incidencia y la etiología de la bacteriemia es aconsejable que, al menos una vez al año y preferiblemente cada mes, se recojan y ordenen los datos generados en el procesamiento diario de los hemocultivos.

Se obtendrán la cifra total de hemocultivos procesados, el número de pacientes a los que corresponde, el número de hemocultivos positivos, diferenciando los verdaderos positivos de los contaminantes, la cifra de pacientes con bacteriemia, así como la incidencia de todas las especies aisladas. Si es posible, todos los datos mencionados se desglosarán por servicios, lo que permitirá valorar brotes epidémicos y la calidad de la extracción por el índice de contaminaciones de cada uno.

CONTROL DE CALIDAD

Los medios de cultivo y reactivos empleados en el procesamiento de los hemocultivos deberán cumplir las normas de control de cada laboratorio.

Control de los aparatos automáticos. En cuanto al aspecto técnico es muy importante respetar estrictamente las normas del fabricante.

Falsos positivos. No deberán superar el porcentaje garantizado por cada sistema automático.

Falsos negativos. Es conveniente comprobar con cierta regularidad que no sobrepasen el 0,5%. Una forma sencilla de hacerlo es realizando periódicamente subcultivo de salida a todos los frascos que hayan cumplido el período de incubación.

Pseudobacteriemias. Ante un aumento de su incidencia se revisarán exhaustivamente los procedimientos de extracción y procesamiento de los hemocultivos.

Eficacia. Para verificar la eficacia del procesamiento utilizado se aconseja inocular en un frasco, de forma confidencial, un microorganismo de difícil crecimiento como *Haemophilus* o *Campylobacter*.

RECOMENDACIONES

1.- La extracción de los hemocultivos seguirá unas medidas de asepsia muy rigurosas. Se informará periódicamente al personal encargado de la extracción de la importancia de los hemocultivos, de los problemas que conlleva la contaminación de esta muestra y de las normas a seguir para una adecuada recogida. Durante la extracción y el procesamiento de los hemocultivos se tomarán las medidas de protección adecuadas para evitar la adquisición de infecciones como hepatitis e infección por VIH.

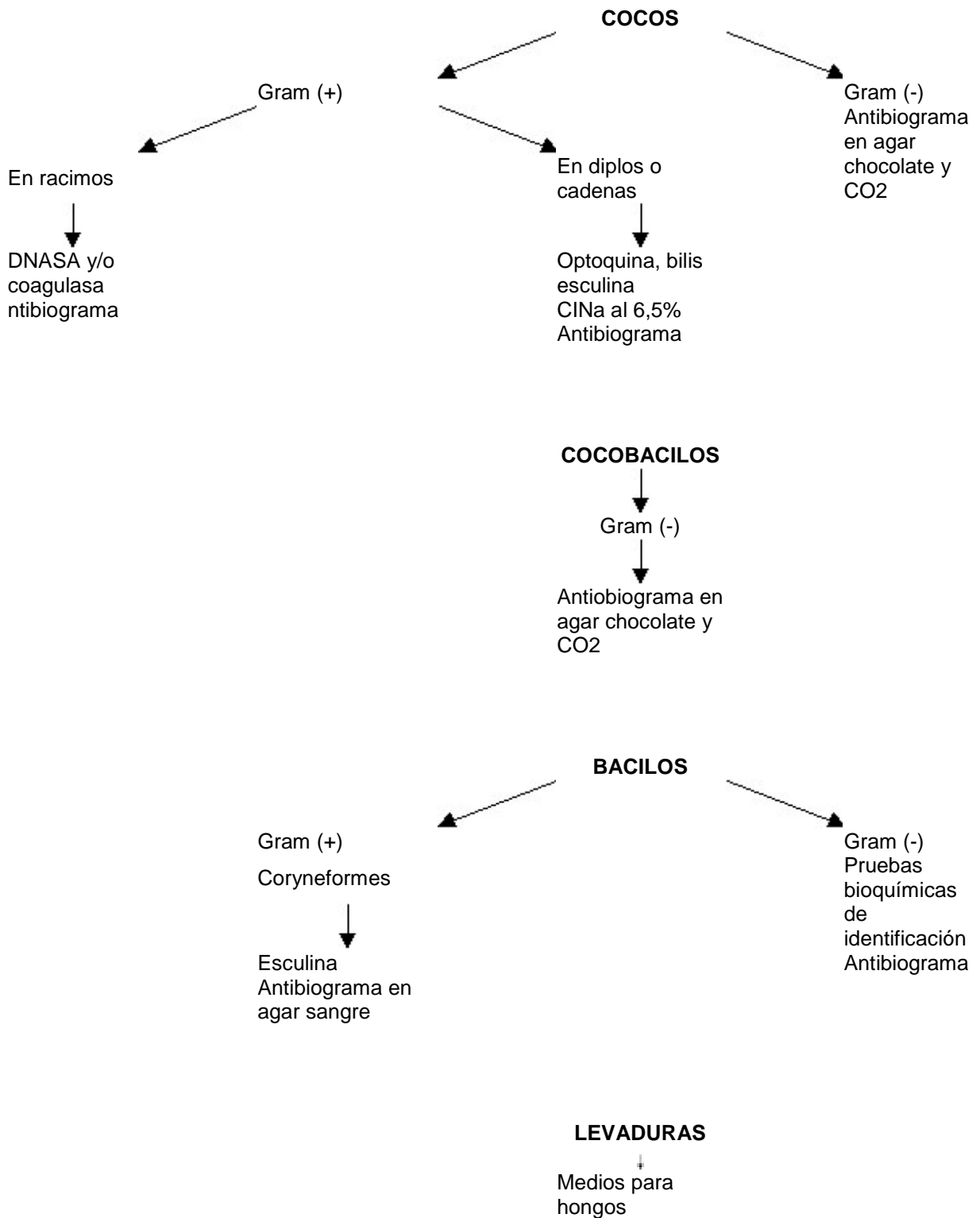
2.- Se extraerán dos o tres hemocultivos por venopunciones diferentes, cada una con un volumen de sangre de 10 ml. que se repartirá a partes iguales en un medio aerobio y en un medio anaerobio.

3.- El frasco aerobio se ventilará y en el anaerobio se evitará la entrada de aire.

4.- Los frascos se incubarán lo antes posible en estufa de 35-37°C. Nunca se mantendrán en nevera.

5.- Entre las 18 y las 24 primeras horas de incubación se realizará una lectura macroscópica de los frascos. A los que no tengan signos de crecimiento se les efectuará una tinción con naranja de acridina o un subcultivo ciego. Este procesamiento inicial no es necesario si se utilizan aparatos automáticos de lectura basados en la detección de CO₂.

ESQUEMA DE IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE HEMOCULTIVOS



6. - Los hemocultivos se incubarán 5-7 días salvo en los que se sospeche bacteriemia por microorganismos de difícil crecimiento en los que se extenderá la incubación hasta 4 semanas. Durante la primera semana de

incubación los hemocultivos serán examinados diariamente, mediante inspección visual o leídos en los sistemas automáticos, para detectar lo antes posible signos de crecimiento bacteriano. Después

de finalizado el período de incubación se realizará un subcultivo en métodos sólido, que puede evitarse si se utilizan métodos automáticos de lectura.

7.- En los hemocultivos con signos de crecimiento se realizará una tinción de Gram de cuyos resultados se informará lo antes posible al médico responsable de la asistencia al paciente. También se efectuará un subcultivo a medios sólidos para obtener colonias aisladas y pruebas de identificación y sensibilidad a los antimicrobianos.

8.- Si es necesario, se realizarán nuevas pruebas de identificación y sensibilidad a los antibióticos a partir de las colonias aisladas que serán informadas como resultados definitivos.

9.- El microbiólogo realizará una interpretación de los resultados basada en la identidad del microorganismo, el número de cultivos positivos, las manifestaciones clínicas y el tratamiento antibiótico previo que haya recibido el paciente, lo que necesitará ser compartido con el médico responsable de la asistencia del paciente.

10.- Es necesario realizar controles de calidad de los medios de cultivo, de los reactivos y de los aparatos. La información derivada del análisis estadístico de los resultados orientará sobre la calidad de la técnica de extracción y del procesamiento y dará una información válida sobre la incidencia y la etiología de las bacteriemias en cada hospital.

BIBLIOGRAFIA.

1. Aronson MD, Bor DH. Diagnosis and treatment. Diagnostic decision. Blood Cultures. Ann. Intern. Med. 1987; 106:246-253.
2. Arpi M, Bentzon MW, Jensen J, Frederiksen W. Importance of blood volume cultured in the detection of bacteremia. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989; 8: 838-842.
3. Capdevilla J.A., Planes A.M., Palomar M., et al. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. May 1992. pp.: 403-407.
4. Bouza E, Díaz-López MD, Moreno S, Bernaldo de Quirós JC, Vicente T, Berenguer J. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with and without Human Immunodeficiency Virus Infection. Arch Intern Med. 1993; 153: 496-500.
5. Bryan CS. Clinical implications of positive blood cultures. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 329-353.
6. Goldmann DA, Pier GB. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. Clin. Microbiol. Rev. 1993; 6:176-192.
7. Isenberg H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology. Washington DC. 1992.1.7.1-1.7.11.
8. Kelly AT, Roberts AJ, Henry D et al. Clinical comparison of isolator and BACTEC 660 resin media for blood culture. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 1925- 1927.
9. Levi MH, Gialanella P, Motyl MR, McKittrick JC. Rapid detection of positive blood cultures with the BACTEC NR-660 does not require first-day subculturing. J. Clin. Microbiol. 1988; 26: 2262-2265.
10. Morello J.A, Matushek SM, Dunne WM, Hinds DB. Performance of a BACTEC nonradiometric medium for pediatric blood cultures. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 359-362.
11. Planes Reig AM. Técnicas de hemocultivo. LAB2000. 1990; 5-8.
12. Reller LB, Murray PR, MacLowry JD. Cumitech 1A. Blood Cultures II. Coordinating ed., J.A. Washington II. American Society of Microbiology. Washington DC. 1982.
13. Ruiz I, Almirante B, Ocaña I et al. Bacteriemias y fungemias en pacientes con SIDA. Estudio de 56 episodios. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 1990; 8: 22-26.
14. Washington J.A. Blood cultures: An overview. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989; 8:803-806.
15. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. Rev. Infect. Dis. 1983; 5: 35-53.

16. Wilson ML, Weinstein MP, Reimer LG, Mirret S, Reller LB. Controlled comparison of the Bact/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 323-329.

17. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3: 269-279