

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



62

Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Juan Carlos Rodríguez Díaz

Autores

Juan Carlos Rodríguez Díaz
María del Remedio Guna Serrano
Nieves Larrosa Escartín
Mercedes Marín Arriaza



ISBN:

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

62. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017

Coordinador:

Juan Carlos Rodríguez Díaz¹

Autores:

Juan Carlos Rodríguez Díaz¹
María del Remedio Guna Serrano²
Nieves Larrosa Escartín³
Mercedes Marín Arriaza⁴



¹Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Alicante (Alicante); ²Servicio de Microbiología, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Valencia); ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona); ⁴Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid).

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Definiciones de bacteriemia, fungemia y sepsis.....	6
3.	Código sepsis.....	7
4.	Diagnóstico microbiológico: generalidad.....	8
5.	Biomarcadores.....	10
6.	Características Clínicas y Etiología.....	10
	6.1. Bacteriemia/fungemia.....	11
	6.2. Bacteriemia/fungemia asociada a catéter.....	11
	6.3. Endocarditis infecciosa.....	11
7.	Fase preanalítica.....	12
	7.1. Indicaciones de los hemocultivos.....	12
	7.2. Extracción de muestras.....	12
	7.3. Hemocultivos contaminados.....	14
	7.4. Bacteriemia asociada a catéter: extracción de las muestras.....	15
	7.5. Endocarditis: extracción de las muestras.....	16
8.	Transporte y conservación de las muestras.....	16
9.	Recepción y registro de los hemocultivos.....	16
10.	Criterios de rechazo.....	17
11.	Normas de bioseguridad.....	17
12.	Tipos de hemocultivos:.....	17
	12.1. Fundamento de los métodos automatizados.....	17
	12.2. Tipos de frascos.....	18
13.	Procesamiento de los hemocultivos para aislamiento de bacterias habituales.....	19
14.	Aislamiento de bacterias con requerimientos especiales.....	19
	14.1. Brucelosis.....	19
	14.2. Tularemia.....	19
	14.3. <i>Leptospira</i> spp.....	20
	14.4. <i>Bartonella</i> spp.....	20
	14.5. <i>Legionella</i> spp.....	20
	14.6. Bacterias deficientes en pared.....	20
	14.7. <i>Campylobacter</i> spp. y <i>Helicobacter</i> spp.....	21
	14.8. <i>Tropheryma whipplei</i>	21
	14.9. <i>Rickettsia</i> spp.....	21
	14.10. Cocos grampositivos con requerimientos nutricionales especiales.....	21

14.11. <i>Treponema pallidum</i>	21
14.12. Micobacterias.....	21
15. Aislamiento de hongos.....	22
16. Aislamiento de <i>Leishmania</i> spp.....	22
17. Procesamiento de los hemocultivos positivos.....	23
17.1 Tinciones.....	23
17.2. Subcultivos.....	23
17.3. Interpretación de resultados.....	24
17.4. Prevención de las contaminaciones.....	24
18. Información de resultados.....	25
19. Diagnóstico etiológico por procedimientos no basados en el cultivo: aspectos generales.....	26
19.1. Serología.....	26
19.2. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos.....	26
19.3 Técnicas basadas en el estudio del proteoma bacteriano/fúngico.....	27
20. Clasificación de las técnicas en función de la muestra procesada.....	27
20.1. Técnicas destinadas al diagnóstico etiológico aplicables sobre hemocultivos positivos.....	27
20.1.1. Técnicas de amplificación.....	28
20.1.2. Técnicas de hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes.....	28
20.1.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	28
20.1.4. Técnicas inmunocromatográficas.....	29
21. Técnicas destinadas al diagnóstico etiológico aplicables directamente sobre la sangre del paciente...29	
22. Métodos de estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los microorganismos.....	33
22.1. Métodos fenotípicos.....	33
22.2. Métodos de amplificación genómica.....	33
22.3. Técnicas inmunocromatográficas.....	35
22.4. Métodos de imagen.....	35
22.5. Nefelometría.....	35
22.6. Futuro.....	36
23. Control de calidad.....	36
24. Conclusiones.....	37
25. Bibliografía.....	37

DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-HMM-01. Procesamiento de hemocultivos

PNT-HMM-02. Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry)

1. INTRODUCCIÓN

En 1993 se publicó el número 3a de los Procedimientos en Microbiología Clínica titulado “Hemocultivos”. Desde entonces se han producido importantes cambios en la incidencia y en la etiología de la bacteriemia y la fungemia, así como en los métodos de detección, por lo que la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ha considerado necesario revisar y poner al día este procedimiento teniendo en cuenta todos estos aspectos.

El presente documento se estructura en dos apartados: el primero constituye una guía práctica de recomendaciones para los microbiólogos clínicos basada en la información publicada y el segundo se justifica por la necesidad de disponer de protocolos de trabajo normalizados (PNT) para la certificación de los laboratorios según las normas ISO, pudiendo posteriormente ser adaptado a las particularidades de cada laboratorio. Los protocolos de cada centro deben adaptarse a las características propias del mismo en relación a los recursos humanos y materiales disponibles, horario de funcionamiento del laboratorio, tipo de pacientes y tasas de resistencia local. Es muy importante tener en cuenta que la utilidad de los resultados disminuye de forma notoria si éstos no se comunican de forma inmediata a los responsables del manejo del paciente para que puedan adoptarse las decisiones adecuadas en función de esta información. Así, es de especial importancia la creación en cada centro de grupos multidisciplinares (microbiólogos, infectólogos, internistas, intensivistas, farmacéuticos, preventivistas, etc.) que puedan abordar esta importante patología infecciosa de forma conjunta. Si esta colaboración se hace adecuadamente se puede mejorar el tratamiento antimicrobiano del paciente, disminuyendo el tiempo en el que éste puede estar recibiendo una terapia empírica inadecuada y el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro. Este hecho conlleva ventajas evidentes para el paciente y para la comunidad derivadas de la disminución de las complicaciones relacionadas con estos tratamientos y del mayor control de la resistencia antibiótica; además, supone un importante ahorro del gasto sanitario.

2. DEFINICIONES DE BACTERIEMIA, FUNGEMIA Y SEPSIS

La detección de la bacteriemia y la fungemia constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología Clínica, dada su importancia diagnóstica y pronóstica. Estos procesos se asocian a una mortalidad elevada, que puede oscilar entre el 10% y el 30% según las series y según el tipo de paciente, el origen y el manejo inicial. La gravedad de esta entidad clínica requiere de la administración rápida de tratamiento antibiótico empírico en función de los datos clínicos y de la epidemiología local de la resistencia antibiótica. A pesar de esto, el porcentaje de tratamientos inadecuados puede alcanzar hasta un 25-30%, siendo este dato especialmente determinante en pacientes con enfermedades de base, con procesos graves o en centros con elevadas tasas de microorganismos multirresistentes.

Se define como bacteriemia la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos. El origen de la bacteriemia puede ser diverso en función de las características clínicas del paciente. El término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre, generalmente levaduras del género *Candida* spp. que, aunque pueden originarse a partir de focos semejantes a los que ocasionan las bacteriemias, frecuentemente tienen su origen en la infección de catéteres.

La bacteriemia y la fungemia son por tanto complicaciones graves de las infecciones bacterianas y fúngicas, respectivamente. Para su detección en el laboratorio la metodología diagnóstica es muy similar, por lo que se describirán de forma conjunta. Ambas se producen cuando los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. Esta invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular (a través de los capilares sanguíneos o de los vasos linfáticos) o desde un foco intravascular (endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales).

La bacteriemia y la fungemia se clasifican, atendiendo al momento de aparición, en nosocomial,

comunitaria o asociada a los cuidados sanitarios.

Atendiendo al origen se dividen en primarias (o de origen desconocido) y secundarias a una infección localizada y en general documentada microbiológicamente. En función del patrón clínico se diferencian también en transitorias, intermitentes y persistentes. Las primeras son las más frecuentes y aparecen al inicio de ciertas infecciones bacterianas locales como la neumonía, la meningitis y las infecciones urinarias complicadas o durante procedimientos en contacto con mucosas contaminadas. Las intermitentes se desarrollan cuando se producen recurrencias periódicas por el mismo microorganismo y traducen la presencia de una infección localizada en espacios cerrados no drenados como los abscesos intraabdominales. Por último, las persistentes suelen acompañar a una endocarditis u otra infección endovascular como la tromboflebitis supurada o la originada en un catéter intravascular infectado. Se consideran bacteriemias de brecha aquellas que se producen a pesar de que el paciente esté recibiendo un tratamiento antibiótico adecuado tras hemocultivos de control previos negativos.

Actualmente, la sepsis se define como una disfunción orgánica que amenaza la vida de un paciente causada por una respuesta no regulada del individuo frente a la infección. Como en la práctica clínica se requiere una herramienta diagnóstica que sustituya a los criterios inespecíficos del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), tradicionalmente utilizados en la identificación de este proceso, se ha optado por una nueva escala, denominada qSOFA (*quick* SOFA), que incluye exclusivamente criterios clínicos, por lo que es fácilmente aplicable en cualquier nivel asistencial (no sólo en el hospital). Esta escala tiene en cuenta la alteración del nivel de conciencia, la presencia de una presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg y/ o la presencia de una frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm (respiraciones por minuto).

Se define shock séptico como el cuadro de sepsis que cursa con alteraciones circulatorias, celulares y del metabolismo lo suficientemente profundas como para aumentar sustancialmente la mortalidad. Estos pacientes presentan requerimientos vasopresores para mantener una presión arterial media ≥ 65 mm Hg y un nivel de lactato sérico > 2 mmol/L (> 18 mg/dL) a pesar de una adecuada resucitación con fluidos. Esta situación aumenta la

mortalidad a cifras superiores al 40%. Tras el último consenso se han eliminado términos redundantes como el de sepsis grave y todas aquellas situaciones consideradas como sepsis por cursar con SRIS pero que, al no asociarse fallo multiorgánico, pasan a considerarse cuadros infecciosos no complicados.

3. CÓDIGO SEPSIS

La creación de un código específico para el manejo de la sepsis obedece al hecho de que ésta es la principal causa infecciosa de muerte, afectando a 100-150 de cada 100.000 habitantes/año, lo que supone en nuestro país más de 50.000 pacientes/año de los cuales pueden fallecer más de una tercera parte. Al igual que ocurre con otras patologías como el politraumatismo, el infarto agudo de miocardio o el ictus, la mortalidad asociada a un cuadro de sepsis puede combatirse con un diagnóstico correcto y un manejo adecuado en las primeras horas de comienzo. En este sentido, se ha comunicado que los pacientes tendrán una supervivencia cercana al 80% si reciben un soporte hemodinámico y un tratamiento antibiótico adecuado en la primera hora y que la mortalidad se incrementa aproximadamente el 7,6 % por cada hora de retraso en la instauración del tratamiento antibiótico desde el inicio del shock o de la sepsis. La aplicación del paquete de medidas recomendadas por la *Surviving Sepsis Campaign* (SSC) logra disminuir la morbilidad y la mortalidad a cifras en torno al 25%. Los elementos básicos de esta intervención se centran en la detección precoz de los pacientes de riesgo y la rápida aplicación de un conjunto de medidas dirigidas a establecer un diagnóstico etiológico, monitorizar los diferentes órganos susceptibles de fallo, iniciar un tratamiento empírico con antibióticos, la resucitación con fluidos y el soporte vital órgano-específico.

El objetivo del “código sepsis” es la detección precoz de los pacientes con sepsis (en los diferentes niveles asistenciales), la aplicación precoz y estructurada del conjunto de medidas recomendadas para diagnosticar, monitorizar y tratar a estos enfermos y la definición de unos indicadores asistenciales que permitan evaluar el cumplimiento de las recomendaciones y los resultados de la aplicación del código a nivel local y nacional (<http://www.codigosepsis.com/es>). Aunque estas recomendaciones son adaptadas en cada centro de forma individual

se recomienda la toma de 2-3 hemocultivos de manera precoz, a poder ser antes del inicio del tratamiento antimicrobiano (idealmente en la primera hora), además de la recogida de otras muestras clínicas representativas del probable foco de la infección. Sobre estas muestras se deben aplicar todas las técnicas diagnósticas rápidas disponibles para emitir informes preliminares en el menor plazo de tiempo posible.

Para optimizar todo el proceso se están desarrollando herramientas informáticas utilizables desde el teléfono móvil (SEPSIS APP) que facilitarán el acceso a los últimos avances y permitirán la toma de decisiones en el diagnóstico precoz, la estratificación, el manejo clínico y el seguimiento del paciente con sepsis.

4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: GENERALIDADES

Se debe tener en cuenta la escasa cantidad de microorganismos presentes en la sangre durante un episodio de bacteriemia, que suele oscilar entre 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y 10^4 UFC/ml pudiendo ser incluso inferior a 0,1 UFC/ml en un 20% de los casos. Esta característica hace que sólo las técnicas muy sensibles puedan ser utilizadas en el diagnóstico rápido de este proceso y que no sea posible utilizar el examen directo de la sangre mediante tinciones para el diagnóstico de la bacteriemia.

Por tanto, el hemocultivo sigue siendo actualmente el principal método de diagnóstico para determinar la etiología de una bacteriemia. Su fácil realización lo hace asequible a cualquier centro y es el único método que hasta el momento permite el aislamiento del microorganismo viable, necesario para determinar su sensibilidad antibiótica. Su utilidad, sin embargo, está muy asociada a que se realice exclusivamente en pacientes con clínica compatible con bacteriemia porque la extracción en otras circunstancias incrementa el gasto sanitario y no aporta información clínicamente útil. Su valor práctico en el diagnóstico se ve perjudicado por el retraso en la obtención de resultados y porque no es positivo en todos los pacientes, siendo su rendimiento más bajo en pacientes con tratamiento

antibiótico o si la infección se produce por hongos, por bacterias de crecimiento lento o por aquellas con requerimientos especiales de crecimiento. Otro factor limitante clave es la elevada proporción de hemocultivos contaminados por microorganismos pertenecientes a la microbiota de la piel; este proceso genera errores diagnósticos, tratamientos inadecuados y ocasiona un elevado gasto económico para el sistema sanitario.

La sensibilidad de los hemocultivos está en gran medida relacionada con el volumen de la muestra, el momento de la extracción y la ausencia de tratamientos antibióticos previos. Tras la positividad del hemocultivo sigue siendo obligado realizar una tinción de Gram a partir de una alícuota de dicho hemocultivo para confirmar la presencia de bacterias u hongos en el frasco, orientar los procedimientos a seguir y realizar un informe preliminar, muy útil en la práctica clínica ya que dicha información aporta una primera aproximación sobre la etiología de la infección y por lo tanto debe ser comunicada de forma inmediata al médico responsable del paciente.

A partir de este momento la identificación del microorganismo causal se puede lograr siguiendo diversos algoritmos en función de las características de cada centro, pero en general se realizan subcultivos en medios sólidos y se utilizan sistemas rápidos no basados en el cultivo que permiten informar al clínico de forma precoz sobre la etiología del proceso y en ocasiones la sensibilidad antibiótica del microorganismo implicado.

Independientemente del método de identificación usado, éste siempre debe acompañarse de la realización de un antibiograma directamente de la sangre del hemocultivo positivo. Aunque actualmente las recomendaciones del *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* no avalan estos protocolos para emitir un informe definitivo, diversos estudios muestran una elevada correlación con el antibiograma definitivo realizado a partir de colonias aisladas con el consiguiente avance en el tiempo en la adecuación del tratamiento antimicrobiano de estos pacientes. Estos datos se deben considerar preliminares y siempre deben confirmarse por los métodos validados. Tanto el EUCAST como el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* están desarrollando protocolos que permitan estandarizar su realización.

5. BIOMARCADORES

En los últimos años, diversos autores están tratando de encontrar un biomarcador que permita, de forma más rápida que el hemocultivo, detectar la presencia de un cuadro infeccioso, diferenciando el proceso de un SRIS de otra etiología. Se está investigando la utilidad de un gran número de moléculas que reflejan cambios bioquímicos en el plasma (sistema del complemento, sistema de la coagulación y sistema calicreína-quinina) y en indicadores de la activación o regulación de los elementos celulares (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células endoteliales), que pueden conducir a la liberación de una serie de mediadores y moléculas (citoquinas, quimioquinas y proteínas de fase aguda). Idealmente estas moléculas deberían permitir ajustar o incluso interrumpir en algunas situaciones el tratamiento antimicrobiano, contribuir a establecer la gravedad del paciente y permitir monitorizar su evolución.

La procalcitonina (PCT), precursor polipeptídico de la calcitonina, es una proteína sintetizada en la glándula tiroides y por las células neuroendocrinas del pulmón. Sus niveles en personas sanas son casi indetectables (<0,05 ng/ml). Posee una particular cinética que resulta muy útil para tomar decisiones de cribado en la atención al paciente con sospecha de padecer una infección bacteriana ya que parece que las citoquinas y las endotoxinas liberadas en estos procesos bacterianos inhiben el paso final de PCT a calcitonina, hecho que origina que aumenten sus valores específicamente en relación directa a la carga bacteriana. Así la PCT aumenta su concentración en la sangre a las 2-6 h tras el estímulo bacteriano y los valores máximos se alcanzan en 12-36 h (vida media 20-36 h).

Existe controversia sobre los puntos de corte más útiles y se postulan valores situados entre 0,5 ng/ml y 10 ng/ml y en función de los mismos, se comunican valores de sensibilidad variables, entre el 75 y el 98%. Diferentes autores han informado valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90% si se utiliza el punto de corte de 2 ng/ml, pero la sensibilidad aumenta al 98% si dicho punto de corte se eleva a 10 ng/ml aunque disminuye la especificidad a un 87%. Es conocido que los valores de este marcador son superiores en infecciones causadas por bacilos gramnegativos y también ha mostrado

su utilidad en la predicción del pronóstico mediante controles seriados de forma que una disminución del 30-50% de PCT en sangre puede deberse a que el proceso se está resolviendo o que ha cesado el estímulo bacteriano. Además, la PCT mantiene su capacidad diagnóstica y predictiva en caso de enfermos tiroidectomizados (ya que se puede producir por otros tejidos), con insuficiencia renal o cirrosis, pacientes oncohematológicos y neutropénicos, ancianos o con enfermedades autoinmunes o reumatológicas.

La proteína C reactiva (PCR), es una proteína de fase aguda liberada por los hepatocitos en respuesta a cualquier tipo de proceso infeccioso (bacteriano o vírico) o inflamatorio, lo que limita su capacidad diagnóstica y pronóstica. Se han publicado diversos estudios en los que se consiguen mejores resultados si se utiliza conjuntamente con otros biomarcadores. Tiene una cinética más lenta, comenzando a elevarse en sangre a las 12 horas, por lo que es menos útil en el diagnóstico inicial del cuadro agudo. Además, la PCR puede continuar elevada aun cuando la infección esté remitiendo y existen diversos procesos inflamatorios, agudos y crónicos, que pueden aumentar sus niveles disminuyendo su sensibilidad y especificidad significativamente respecto a la PCT.

La interleucina 6 (IL-6) destaca junto a la IL-8, como una de las citoquinas con mayor sensibilidad y especificidad para distinguir sepsis de un SRIS no infeccioso. Además, tiene un elevado poder predictivo de mortalidad. Se ha usado sobre todo en pediatría porque en niños los valores de PCT son fisiológicamente muy superiores a los que se detectan en la población adulta. También se ha demostrado el valor diagnóstico y pronóstico de ambas interleucinas en pacientes neutropénicos. Según algunos autores la IL-6 tendría mayor valor diagnóstico de sepsis en población adulta que la IL-8, pero menor que la PCT.

Otro biomarcador de respuesta inflamatoria e infección es la región medial de la proadrenomedulina (MRproADM), altamente estable. La MRproADM se ha mostrado superior a la PCT en la capacidad predictiva de mortalidad a corto (7-30 días) y a medio plazo (90-180 días) e incluso en estudios con seguimiento de un año (la mayoría en pacientes con neumonía comunitaria). También se ha demostrado su utilidad en la discriminación de infección

bacteriana respecto a la vírica, en el diagnóstico de sepsis y en la predicción de su evolución a shock séptico. Un aspecto importante de la MRproADM es que sus niveles aumentan con la edad, lo que obliga a modificar los puntos de corte en mayores de 70 años.

El lactato no es en sí un biomarcador que permita diferenciar la sepsis de un SRIS no infeccioso, sino que es el mejor indicador de la presencia de hipoperfusión e hipoxia tisular y predice la respuesta al tratamiento. Además, su determinación es rápida y barata y por tanto está incluido en todas las recomendaciones de valoración de los pacientes con sepsis y shock séptico. Un valor superior a 2 mmol/l es predictor de gravedad, mala evolución y mortalidad, aunque su mayor rendimiento pronóstico se obtiene cuando se combina con otros biomarcadores.

En el futuro las nuevas herramientas que permitan estudiar el metaboloma, y por tanto puedan medir la presencia de todos los metabolitos producidos en cada momento, pueden aportar información muy útil si se identifican los marcadores que permitan caracterizar y predecir mejor la evolución del proceso. También se ha postulado la utilidad de la detección de marcadores genéticos del huésped (“RNA biosignatures”) presentes en el suero como respuesta a infecciones bacterianas.

6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ETIOLOGÍA

6.1. BACTERIEMIA/FUNGEMIA

La bacteriemia/fungemia se presenta a cualquier edad, estando especialmente predispuestos a padecer este proceso 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 incidencia de la bacteriemia depende del tipo de población estudiada (5-30 casos por 1000 pacientes hospitalizados). Sus manifestaciones clínicas son muy variadas y oscilan desde aquellos cuadros inaparentes (paso puntual a sangre de una baja carga microbiana) hasta lo que se conoce como shock séptico caracterizado por la presencia de fracaso multiorgánico. Los focos más frecuentes de bacteriemia son el tracto genitourinario, las heridas

quirúrgicas, el tracto gastrointestinal y los catéteres intravasculares, aunque hasta en un 25% de los casos su foco originario es desconocido. En relación a las fungemias, el foco más frecuente es el catéter.

El diagnóstico definitivo de la bacteriemia/fungemia se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre del enfermo mediante el cultivo de ésta. El aislamiento del agente responsable es trascendente, además, para conocer su sensibilidad a los antimicrobianos e instaurar el tratamiento o las modificaciones necesarias de la terapia empírica ya establecida. El conocimiento del microorganismo puede orientar a la realización de pruebas diagnósticas complementarias para buscar posibles localizaciones metastásicas y en ocasiones para confirmar el diagnóstico de patologías no infecciosas como la neoplasia de colon.

En la distribución de los agentes causales de la bacteriemia, los microorganismos grampositivos más frecuentemente implicados pertenecen a los géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. En relación a los bacilos gramnegativos, los más frecuentemente aislados son especies de la familia de las enterobacterias. Esta etiología va a estar condicionada por el origen de la infección (comunitaria, nosocomial o asociada a cuidados sanitarios) y los factores predisponentes del huésped.

En cuanto a la fungemia, aunque *Candida albicans* ha sido la levadura más frecuentemente implicada, en los últimos años se está observando un notable incremento de infecciones por otras especies del género como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*.

La etiología de la bacteriemia en el niño ha sufrido también variaciones, determinadas por la epidemiología local y la política antibiótica, pero también por los programas de vacunación y los microorganismos emergentes. En el primer mes de vida la etiología más frecuente está asociada a bacterias de transmisión vertical (*Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*) y posteriormente, cuando la adquisición es comunitaria, aparecen bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, enterobacterias, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria meningitidis*. Ante la sospecha de artritis se debe tener presente *Kingella kingae*.

En los niños hospitalizados, la mayoría portadores de catéteres intravasculares, existe la posibilidad de que la bacteriemia esté causada por estafilococos coagulasa negativa de origen en el catéter. En los pacientes inmunodeprimidos deben considerarse además *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida* spp.

6.2. BACTERIEMIA/FUNGEMIA ASOCIADA A CATÉTER

Un elevado número de los pacientes hospitalizados son portadores de un catéter vascular, habitualmente colocado en las venas periféricas, situación con poco riesgo potencial de complicaciones infecciosas por su corto periodo de utilización. En aquellos casos en que los catéteres se colocan en venas centrales o en arterias existe un riesgo elevado de complicaciones infecciosas locales o sistémicas que varían en función del tipo y la composición del catéter y del tiempo de persistencia y los cuidados que éste recibe.

Estos dispositivos se asocian con casi el 50% de las bacteriemias hospitalarias siendo la prevalencia publicada por el Estudio de Prevalencia de la Infección Nosocomial en España (EPINE) en el año 2016 de 1,18 episodios por 100 enfermos. Estas infecciones están causadas en su mayoría por estafilococos coagulasa negativa, generalmente *Staphylococcus epidermidis*. Con menor frecuencia pueden serlo por *S. aureus*, *Enterococcus* spp. y diversas especies de bacilos gramnegativos o levaduras del género *Candida*. La infección asociada a catéter puede no presentar signos locales y con frecuencia el punto de inserción parece normal; esto es lo que hace que, en ausencia de otro foco evidente, se considere al catéter como el potencial responsable de la bacteriemia, sobre todo cuando el microorganismo aislado se asocia típicamente con este proceso o cuando la sepsis es de adquisición nosocomial.

6.3. ENDOCARDITIS INFECCIOSA

La endocarditis infecciosa (EI) es una enfermedad multiorgánica que se produce por la infección de la superficie del endocardio por microorganismos, principalmente bacterias. Suele afectar sobre todo a las válvulas cardíacas tanto naturales como pro-

tésicas, pero también a dispositivos intracardiacos como desfibriladores y marcapasos. En este sentido, la presencia de material protésico intracardiaco es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.

La endocarditis infecciosa es un proceso complejo en el que participan el daño tisular presente en el endotelio cardíaco, la virulencia del microorganismo causal y la inmunidad del paciente. La patogenia de la enfermedad se asocia a una alteración previa de la superficie valvular, que se coloniza por microorganismos tras una bacteriemia (o más raramente fungemia) y que puede ser transitoria. La proliferación de los microorganismos da lugar a un daño del tejido valvular y a la formación de una vegetación o verruga.

La infección de la válvula, del endotelio cardíaco o del material protésico existente da lugar a una bacteriemia continua de bajo grado, que puede producir infecciones a distancia (metástasis infecciosas) y afectar a otros órganos como bazo, cerebro, hueso vertebral, ojos, etc.

La EI es una enfermedad grave que está asociada a una elevada mortalidad (en torno al 25% de los casos) a pesar de los avances diagnósticos y de tratamiento que se han producido en los últimos años. Su incidencia se encuentra entre 1.5-11.6 casos/100.000 habitantes-año, según las distintas series publicadas. Actualmente en nuestro país, ha sido estimada en 3.5 casos/100.000 habitantes-año (datos de la serie del Grupo de Apoyo al Manejo de la Endocarditis Infecciosa en España).

La EI se puede manifestar de forma aguda o subaguda y afectar a válvulas naturales o protésicas. En el caso de estas últimas puede ser precoz o tardía, según se produzca antes o después de los 12 meses de la cirugía de implantación. Esta diferenciación tiene importancia debido a la diferente etiopatogenia en ambos periodos y que estaría relacionada con el mecanismo de adquisición de la infección (en la cirugía de recambio valvular o por una bacteriemia posterior).

La etiología de la EI puede ser muy variable y depende de varios factores entre los que están las características del paciente (área geográfica, nivel socioeconómico, edad, enfermedades de base, origen nosocomial o comunitario, etc.), el tipo de vál-

vula afectada, la presencia de material protésico, el uso de catéteres permanentes, etc. La mayor parte de los casos (hasta en un 80%) están causados por bacterias grampositivas de los géneros *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. En las últimas décadas se ha descrito un descenso de los casos producidos por *Streptococcus* del grupo viridans y un aumento de las causadas por *Staphylococcus* spp., tanto *S. aureus* (que es actualmente el patógeno más frecuente en la EI) como estafilococos coagulasa negativa, hecho que está asociado al incremento del número de pacientes portadores de material protésico intracardiaco y posiblemente también al mayor uso de catéteres. La proporción de EI causadas por *Enterococcus* spp. y por *Streptococcus* del grupo *bovis* también está en aumento, quizás en relación con la mayor edad de los pacientes y la presencia de patología intestinal subyacente.

Las bacterias gramnegativas son causa de EI en alrededor de un 5% de los casos; en su mayoría son bacterias del grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*). Las enterobacterias y *P. aeruginosa* producen raramente EI, asociándose casi siempre a un origen nosocomial en pacientes portadores de material protésico. La endocarditis por *Brucella* spp., es muy infrecuente actualmente.

Las bacterias difíciles de cultivar como *Coxiella burnetii*, *Tropheryma whipplei*, *Bartonella hensalae* y *Bartonella quintana* son causa de EI en un 1,5% y se asocian a endocarditis con hemocultivos negativos. Su proporción es variable en las distintas series y su diagnóstico depende en gran medida del empleo de métodos microbiológicos no basados en el cultivo, fundamentalmente serología y métodos moleculares.

Las bacterias anaerobias se aíslan en alrededor de un 1% de los casos y los hongos en un 2,5%, siendo en la gran mayoría levaduras del género *Candida*. La EI polimicrobiana es muy poco frecuente y suele representar un 1,5% de los casos. Otros microorganismos como las micobacterias no tuberculosas, *Corynebacterium* spp., *L. monocytogenes* y *Propionibacterium acnes* se han descrito puntualmente como causa de endocarditis. La endocarditis por *Chlamydia* spp., *Legionella* spp. y *Mycoplasma* spp. es un asunto debatido ya que la mayoría de

casos descritos estaban diagnosticados por serología y desde que se emplean métodos moleculares su detección es anecdótica.

7. FASE PREANALÍTICA

7.1. INDICACIONES DE LOS HEMOCULTIVOS

No existe una recomendación universal sobre cuáles son las indicaciones de la toma de hemocultivos aunque generalmente se recomienda su extracción ante la presencia de escalofríos, fiebre (temperatura corporal $\geq 38^{\circ}\text{C}$) o hipotermia en neonatos y pacientes ancianos. También ante leucopenia, leucocitosis o trombopenia no relacionada con procesos hematológicos, otros signos de infección focal o sepsis, así como en el caso de sospecha de endocarditis. Además, siempre se deben extraer cuando se envía a cultivar un catéter por sospecha de bacteriemia originada en el mismo.

En relación con la sospecha de infección, se deben extraer hemocultivos en pacientes susceptibles de padecer 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.). La extracción de hemocultivos está indicada, asimismo, en niños pequeños o ancianos con un decaimiento súbito, ya que en estas poblaciones pueden no presentarse los signos y síntomas típicos de la bacteriemia. El cultivo de la sangre debe complementarse con el de muestras de otras localizaciones para tratar de determinar el foco del proceso.

7.2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

La aplicación de una buena metodología para la extracción y procesamiento de los hemocultivos debe perseguir, como ya se describió en el Procedimiento en Microbiología Clínica sobre los hemocultivos (Loza Fernández de Bobadilla E (coordinadora). Hemocultivos. 3a. SEIMC 2003):

- 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.

- La detección precoz de la presencia de bacterias en sangre, su identificación precisa y la información sobre su perfil de sensibilidad antibiótica de forma que las modificaciones del tratamiento puedan realizarse con la mayor rapidez posible.
- La diferenciación, en la medida de lo posible, de los casos de verdadera bacteriemia de aquellos en los que la positividad se deba a un inadecuado procedimiento de extracción y procesamiento de la muestra.

Es muy importante que el profesional encargado de la toma del hemocultivo tenga formación sobre el momento y el lugar de extracción, la cantidad de sangre que hay que obtener, la atmósfera de los frascos de cultivo (aerobia y anaerobia), el número de extracciones y las condiciones de asepsia que hay que seguir, ya que este proceso formativo es esencial para mejorar la rentabilidad clínica de esta prueba. Con una técnica correcta el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3% de la cantidad total de hemocultivos procesados.

Las muestras de sangre para hemocultivo deben extraerse mediante venopunción (extracción periférica), evitándose la extracción a partir de dispositivos intravasculares tal y como lo recomienda la *American College of Physicians*, cambiando de equipo y localización anatómica en la extracción de cada hemocultivo. Sólo se realizarán extracciones a través del catéter si se pretende diagnosticar una infección del mismo y ésta debe ir acompañada de otra extracción por vía periférica.

El momento de la extracción de la sangre debería coincidir, en el caso de infección aguda, con aquel en el que existe un mayor número de bacterias viables en sangre, que se sabe que es el momento que precede a la aparición de la fiebre. Así se recomienda la extracción coincidiendo con la aparición de escalofríos (se cree que estos suelen preceder inmediatamente al pico febril y que aparecen aproximadamente al cabo de 1h de entrar el microorganismo en el torrente sanguíneo). Por otra parte, la

extracción de sangre debe hacerse antes de iniciar la administración del tratamiento antibiótico y en el caso de que esto no fuera posible, cuando el antibiótico esté en su concentración valle (justo antes de la siguiente dosis).

El volumen de sangre es el factor más importante para aumentar el rendimiento diagnóstico del hemocultivo por lo que el *College of American Pathologists* recomienda que el laboratorio disponga de un sistema para medir este parámetro. Otro factor a tener en cuenta es la dilución de la sangre en el medio de cultivo, necesaria para neutralizar las propiedades bactericidas sanguíneas y el posible tratamiento antimicrobiano recibido por el paciente. En general se siguen las recomendaciones de la *Infectious Diseases Society of America (IDSA)/ American Society for Microbiology (ASM)* según las cuales el volumen de sangre a cultivar está relacionado con el peso del paciente. Así, en niños pequeños se requerirán entre 1 y 5 ml (dilución 1:5), inoculados en un solo frasco aerobio mientras que el volumen de sangre a cultivar admitido para niños mayores y adultos será de 10-20 ml (dilución 1:10), repartidos en los dos frascos (anaerobio y aerobio). En líneas generales se considera que el índice de positividad aumenta entre el 3-5% por cada mililitro adicional de sangre cultivada e incluso se ha valorado la posibilidad de extraer dos hemocultivos aerobios en cada toma, o sea, dos tomas de tres frascos, dos aerobios y un anaerobio.

La probabilidad de recuperar el agente causal se incrementa en relación con el número de hemocultivos extraídos al paciente. Es cercana al 60-80% en el primer hemocultivo, del 80-90% cuando se cursan dos hemocultivos y del 95-99% con el tercer hemocultivo. En adultos se suelen extraer dos o tres hemocultivos en aquellos casos en los que se sospecha sepsis aguda o cualquier infección a distancia y tres o cuatro hemocultivos si existe la posibilidad de que se trate de una endocarditis, una infección de un dispositivo protésico o una infección de catéter en la que puede ser difícil diferenciar entre contaminación y bacteriemia verdadera. En niños, en general se extrae un solo hemocultivo aerobio, y no se recomienda la extracción seriada de hemocultivos excepto en el paciente inmunodeprimido, pero para mejorar el diagnóstico algunos autores recomiendan dos extracciones si el niño pesa más de 1 kg y sólo una extracción si su peso es inferior. Hay estudios

que demuestran que la introducción de un volumen adecuado de sangre en un solo frasco es más rentable que la extracción de varios frascos. Diversos estudios han demostrado que el riesgo de la población pediátrica de desarrollar una bacteriemia por anaerobios es mucho menor que en la población adulta, lo que además apoya el cultivo en un solo frasco en condiciones de aerobiosis; se deberá solicitar de manera explícita dicho cultivo cuando exista alta sospecha clínica de infección por microorganismos anaerobios.

No existe una recomendación universal sobre el intervalo de tiempo a respetar entre cada extracción y aunque por lo general se aconseja que estén separadas 10-30 minutos, este intervalo se puede acortar en situaciones de extrema urgencia e incluso en estos casos, para no retrasar el tratamiento antibiótico, pueden extraerse los hemocultivos simultáneamente de extremidades diferentes. En los casos en los que el foco de infección no está claro y los primeros hemocultivos son negativos, puede estar indicado repetir la extracción tras 24-48 horas. Está recomendado extraer una nueva tanda de hemocultivos a las 48-72h de una bacteriemia ya diagnosticada a fin de conocer si persiste el aislamiento del mismo microorganismo a pesar de tratamiento antimicrobiano, lo que se conoce como bacteriemia complicada. No se recomienda la extracción seriada de hemocultivos en pacientes pediátricos, excepto en los pacientes inmunodeprimidos.

7.3. HEMOCULTIVOS CONTAMINADOS

La extracción de sangre para hemocultivo debe realizarse con las máximas condiciones de asepsia, desinfectando escrupulosamente la piel en el lugar donde se va a efectuar la venopunción y también los tapones de caucho de los frascos de hemocultivo, preferiblemente con clorhexidina alcohólica al 2% en pacientes mayores de 2 meses de edad. Si el paciente tiene menos de esta edad (piel no queratinizada) se recomienda la solución acuosa en lugar del alcohol por el potencial riesgo de quemaduras; de todas formas, al existir varias opciones válidas disponibles, la elección del antiséptico puede variar en función de cada hospital. En cuan-

to al método de aplicación, tradicionalmente se recomienda la realización de movimientos circulares de dentro afuera, aunque también existen trabajos que proponen otros métodos, siempre realizando una fricción vigorosa. Se ha de tener presente que la acción de los antisépticos no es inmediata por lo que deber respetarse el intervalo adecuado de tiempo entre su utilización y la punción (30 segundos aproximadamente en el caso de la clorhexidina y entre 1,5 y 2 minutos si se utiliza povidona). Por otra parte, hay que dejar secar el antiséptico utilizado para limpiar el tapón evitando así su entrada en el interior del frasco al inocular la sangre y la posible inhibición del crecimiento bacteriano.

Es imprescindible la utilización de guantes, preferentemente estériles, y también es útil el empleo de mascarillas desechables durante la extracción del hemocultivo y obviamente no se debe palpar con los dedos el lugar de la venopunción ni hablar o toser mientras se realiza la extracción. No se debe poner algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de su extracción. Se han obtenido muy buenos resultados si los hemocultivos son extraídos por un equipo de personas previamente seleccionadas y formadas.

En todos los hospitales debe vigilarse periódicamente el porcentaje de hemocultivos contaminados y realizar actividades formativas periódicas entre el personal encargado de la extracción de los mismos para difundir la necesidad de que ésta se haga utilizando el protocolo establecido en cada centro.

Los frascos deben inocularse rápidamente (para evitar la coagulación de la sangre y los efectos derivados de la lisis del microorganismo debido a la acción del sistema inmune) sin necesidad de cambiar de aguja, pinchando el tapón de forma perpendicular; esta inoculación rápida se ve favorecida porque actualmente todos los frascos disponibles en el mercado incorporan un sistema de vacío. Siempre se debe pinchar primero el frasco anaerobio, evitando la entrada de aire, y luego el aerobio. Una vez inoculados se agitarán suavemente y se limpiarán los tapones de nuevo, no debiendo cubrirse estos con gasas, algodón o esparadrapo. En la tabla 1 se resume la metodología a seguir para la extracción de hemocultivos.

Tabla 1. Metodología a seguir para la extracción de un hemocultivo

- 1.- Utilización de guantes y mascarilla
- 2.- Limpieza con clorhexidina de los tapones de los viales
- 3.- Selección del lugar de la extracción (no obtener la sangre a través de catéter)
- 4.- Desinfectar la piel con clorhexidina y dejar actuar
- 5.- Realizar la punción sin tocar la piel del paciente con la mano
- 6.- No poner en contacto la aguja con el algodón
- 7.- Extraer la sangre necesaria para que se puedan añadir 10 ml de sangre en cada frasco en el caso de los adultos y entre 1 y 5 ml en el frasco pediátrico
- 8.- Inocular primero el frasco anaerobio evitando la entrada de aire
- 9.- Inocular después del frasco aerobio; no es necesario añadir aire
- 10.- Inocular el resto de los tubos si los hubiere (bioquímica, etc.)
- 11.- Agitar suavemente los dos frascos
- 12.- Llevar de forma urgente al Servicio de Microbiología
- 13.- Si no fuera posible, mantener a temperatura ambiente

7.4. BACTERIEMIA ASOCIADA A CATÉTER: EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los métodos para diagnosticar la bacteriemia de origen en el catéter están previamente descritos en dos protocolos de la SEIMC (Pascual A (coordinador), procedimiento nº 15, SEIMC 2004 y Maciá MD (coordinadora), procedimiento nº 60, SEIMC 2017).

El diagnóstico de este proceso se puede abordar con y sin retirada del catéter. En el caso de que se retire el catéter, la punta del mismo debe enviarse para cultivo y debe ir acompañada con un hemocultivo obtenido dentro de los 30 minutos siguientes a la extracción del mismo.

En aquellos casos en los que se sospeche que el origen de la bacteriemia es el catéter y no sea fácil recambiar o prescindir de éste, se debe utilizar la

técnica del tiempo diferencial de positividad. Se trata de comparar el tiempo que tardan los frascos en dar un resultado positivo, comparando el tiempo de los frascos de hemocultivos extraídos de sangre periférica con los obtenidos a través de cada luz del catéter. Tanto en niños como en adultos, se debe inocular en cada frasco estrictamente la misma cantidad de sangre, hacer todas las tomas a la vez e incubar inmediatamente los frascos en la máquina de hemocultivos. Si el foco es el catéter, el inóculo bacteriano inicial será mayor, por lo que deberá alcanzar su positividad antes, con una diferencia de al menos 120 minutos respecto al hemocultivo con sangre extraída por vía periférica. Si se realiza correctamente, la sensibilidad y la especificidad es elevada, pero si no se realiza bien puede llevar a conclusiones erróneas por lo que no debe hacerse si no existen las condiciones óptimas para ello (protocolo, profesionales formados, etc). Este parámetro está bien validado para infecciones bacterianas pero ocasiona más dudas en el caso de infecciones de catéter asociadas a levaduras por el crecimiento más lento de éstas; así para *Candida glabrata* se plantea un tiempo diferencial de 6 horas.

También se ha abordado el diagnóstico de la bacteriemia asociada a catéter mediante la cuantificación de la cantidad de bacterias presentes en la sangre obtenida de las diferentes localizaciones (catéteres y vía periférica). La cuantificación se puede hacer utilizando tubos de lisis centrifugación obtenidos de las diferentes localizaciones: tras centrifugación de los mismos se realiza un cultivo cuantitativo en placas de agar, considerándose que hay infección en el catéter si el número de bacterias en la muestra obtenida a su través es tres veces superior al de la sangre obtenida por vía periférica, aislándose en ambos casos la misma especie bacteriana.

Otro abordaje es la cuantificación del número de bacterias en sangre mediante la extracción de 1-2 mL de sangre en un tubo con un anticoagulante como el SPS, a partir del cual se prepara una placa de agar sangre mezclando la sangre con 20 mL de agar base. Se debe extraer sangre periférica y sangre de cada una de las luces de cada uno de los catéteres que lleve el paciente, además de un hemocultivo periférico convencional. Se considera que el foco es el catéter cuando la bacteria aislada en la placa de sangre periférica y en la del catéter es la misma y existe una diferencia en el recuento de colonias ≥ 4 veces entre las UFC/ml del cultivo a través del catéter y el realizado mediante venopunción.

7.5. ENDOCARDITIS: EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

La bacteriemia que se produce en los casos de EI suele ser continua, de bajo grado, persistente y no siempre está asociada a picos febriles, con lo que la toma de hemocultivos no debe estar necesariamente relacionada con el pico febril. El volumen de sangre inoculado es muy importante: idealmente debe ser de 10 ml por frasco en adultos (al menos tres parejas de frascos), ya que la bacteriemia es de bajo grado, hay pocas bacterias en sangre y por tanto la reducción del volumen de sangre inoculada disminuiría el rendimiento de los hemocultivos.

En la EI el mismo microorganismo suele crecer en todas las botellas, con lo que el aislamiento de un microorganismo en pocas botellas se debe interpretar cuidadosamente para diferenciar los microorganismos contaminantes, sobre todo en el caso de estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp. y *P. acnes*. En lo referente al tiempo de incubación, en general se utilizan 5 días, del mismo modo que para las bacteriemias de otro origen. Si a los 5 días los cultivos son negativos, se recomienda prolongar la incubación hasta 14 días con la finalidad de recuperar microorganismos de crecimiento lento o exigente como HACEK, *P. acnes*, *Brucella* spp., *Abiotrophia* spp., *Granulicatella* spp, etc. aunque es posible que también se incremente la recuperación de contaminantes.

El empleo del método de lisis centrifugación no aporta claros beneficios sobre los hemocultivos convencionales y sólo se ha recomendado ante la sospecha de *Bartonella* spp. y posiblemente para algunos hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*. En pacientes con alta sospecha clínica de EI y hemocultivo negativo es conveniente hacer un subcultivo tras finalizar el periodo de incubación de las botellas negativas en placas de agar, incluyendo medios para aislar microorganismos exigentes como *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., etc. También se recomienda hacer tinciones de Gram, naranja de acridina y Ziehl-Neelsen, aunque posiblemente el rendimiento de todas estas técnicas sea bajo. Si se dispone de métodos moleculares podría ser conveniente realizar técnicas de biología molecular, específicas o universales, para detectar ADN de microorganismos que no crecen o crecen tan escasamente que no se detectan por el sistema de hemocultivos. Además, en pacientes con hemocultivos negativos debe reali-

zarse al mismo tiempo un estudio serológico frente a *Coxiella burnetii*, *Legionella* spp., *Brucella* spp. *Bartonella* spp. y *Chlamydia* spp.

8. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRA

Una vez obtenida la muestra e inoculados los frascos de hemocultivos, deben identificarse adecuadamente en cuanto a los datos del paciente y las parejas de frascos correspondientes a cada una de las extracciones. Deben enviarse rápidamente al laboratorio conservándolos en todo momento a temperatura ambiente. No se deben conservar en estufas que podrían ocasionar que cuando este frasco se introdujese en el incubador inteligente ya hubiera llegado a la fase de crecimiento estacionario y por tanto no se detectase como positivo. Su conservación en nevera, además de retrasar el crecimiento bacteriano, podría afectar a la viabilidad de los microorganismos. Se ha comunicado que hay una importante disminución de la recuperación de patógenos si en lugar de introducir los frascos inmediatamente en el incubador se mantienen mucho tiempo a temperatura ambiente, por lo que las guías del CLSI recomiendan que se introduzcan los frascos de hemocultivos en el incubador en menos de 2 horas desde su extracción. Se debe valorar también la necesidad de disponer de incubadores satélites en los lugares que no pudieran cumplir este requerimiento. Esta medida, habitualmente sin coste adicional, disminuye el tiempo de respuesta de forma muy importante.

9. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LOS HEMOCULTIVOS

A su llegada al laboratorio es fundamental verificar que los frascos están correctamente identificados en cuanto al paciente y la extracción de la que proceden. Se recomienda, una vez registrada la entrada, la introducción inmediata de los mismos en incubadores específicos. Estos aparatos disponen de programas informáticos que registran el momento de entrada del frasco, la curva de crecimiento, el tiempo de positividad, el momento de descarga e incluso la cantidad de sangre que contienen, entre otros parámetros. Además, suelen estar conectados al sistema informático del laboratorio, lo que permite la transmisión bidireccional automática de datos entre ambos. El retraso en la incubación de los hemocultivos pue-

de comprometer la detección y recuperación de algunos microorganismos siendo causa de demora en la positividad o incluso de falsos negativos.

Debido a que es vital la información rápida de todos los resultados, incluidos los preliminares, es muy importante que toda petición de hemocultivo tenga, además del diagnóstico de sospecha, la información necesaria para que se pueda localizar al médico responsable del paciente de forma fácil y rápida.

10. CRITERIOS DE RECHAZO

En general, no se rechazará nunca un hemocultivo dada la importancia del diagnóstico de la bacteriemia, salvo en el caso en que haya duda en cuanto a la identificación de la muestra o los frascos estén dañados y/o contaminados. Los hemocultivos aceptados para ser procesados se registrarán en el sistema informático (SIL) utilizado por el laboratorio.

11. NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Siempre se debe recordar que la sangre inoculada en los frascos puede contener, además de bacterias u hongos, otros microorganismos viables como los virus causantes de hepatitis o el VIH, que implican un riesgo de infección para la persona que los manipula. Así deben conocerse y respetarse estrictamente las medidas de prevención universales descritas para el manejo de sangre, sobre todo en lo que respecta a la prevención de punciones accidentales con las agujas tanto en su extracción como en la punción que se realiza en el laboratorio en caso de positividad. En este sentido la sustitución de los frascos de vidrio por frascos de plástico ha contribuido a evitar accidentes en el caso de rotura de los mismos. Recientemente algunas compañías han desarrollado sistemas para la punción/extracción de sangre que no conllevan riesgo de punción accidental durante el procesamiento de los frascos positivos.

Otra fuente importante de riesgo biológico es la presencia de bacterias con nivel de bioseguridad 3, como por ejemplo *Brucella* spp. Los aerosoles que se producen en el procesamiento de los frascos positivos pueden ser una fuente importante de contagio de estas patologías. Por tanto, el personal deberá seguir de manera estricta las normas contenidas en el Manual de Seguridad del Labora-

torio de Microbiología Clínica (ver Procedimientos en Microbiología Clínica. J.L. Pérez (coordinador), Procedimiento nº: 10a, SEIMC 2012. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica).

12. TIPOS DE HEMOCULTIVOS

12.1. FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS AUTOMATIZADOS

En pasadas décadas los hemocultivos se procesaban de forma manual y se utilizaban frascos con medio bifásico de Ruiz Castañeda. Actualmente éstos se han sustituido en los laboratorios clínicos por sistemas automatizados de lectura continua que han demostrado una mayor eficiencia.

El desarrollo de los métodos automatizados para el procesamiento de los hemocultivos ha supuesto un avance sustancial ya que los frascos se introducen en sistemas de incubación automatizados (diferentes según la compañía empleada) que mantienen la temperatura de los mismos a unos 36 +/-1°C. Estos sistemas constan de una serie de celdas individuales con agitación continua para facilitar la multiplicación bacteriana y realizan una monitorización periódica para la detección de frascos positivos.

Los modelos más avanzados son:

- El sistema BacT/Alert® VIRTUO™. Es un sistema automatizado que permite incubar, agitar y controlar continuamente el crecimiento de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios. Se trata de un sistema no invasivo basado en tecnología colorimétrica ya que detecta el crecimiento bacteriano porque este ocasiona un aumento en la producción de CO² en el medio y por tanto una modificación del pH que se traduce en un cambio de color en el sensor de la base. Permite la carga y descarga automática de frascos de cultivo con estabilidad térmica de los frascos incubados, lo que supone un menor tiempo de recuperación de los microorganismos. Tiene una cinta transportadora que introduce y extrae los frascos en el sistema y también dispone de un sistema de alerta sobre la existencia de un defecto o exceso en el volumen de sangre inoculada. El equipo es modular y cada módulo tiene una capacidad de 432 celdas.

- El sistema BD BACTEC™ FX es también un sistema automático y modular de monitorización continua destinado a la detección del crecimiento bacteriano en hemocultivos mediante un sensor fluorimétrico de gases integrado en el vial del hemocultivo; los fotodetectores presentes en cada una de las estaciones del instrumento miden el nivel de fluorescencia emitido por cada vial, que se corresponde con la cantidad de CO₂ liberado por los microorganismos. También dispone de un sistema para controlar el volumen de sangre inoculada. Cada instrumento tiene una capacidad de 400 viales y existen sistemas satélites de 40 viales que pueden situarse fuera del laboratorio de Microbiología y por tanto facilitan el procesamiento rápido de las muestras.

12.2. TIPOS DE FRASCOS

Cada compañía desarrolla diferentes frascos con especificaciones concretas; en general, existen frascos diseñados para aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias facultativas y frascos para aislamiento de anaerobios facultativos y estrictos. También existen frascos optimizados para pequeños volúmenes de sangre, útiles en pediatría y los selectivos para micobacterias (medio Middlebrook 7H9) u hongos que se pueden utilizar en casos específicos.

En general, los frascos para cultivo de bacterias aerobias o anaerobias contienen medios de cultivo enriquecidos con diferentes nutrientes que utilizan como anticoagulante SPS (polianetol sulfonato de sodio). El SPS es capaz de neutralizar la actividad bactericida del suero e inhibir la acción de algunos antibióticos como aminoglucósidos y polimixinas por lo que estas ventajas que aporta minimizan el hecho de que puede interferir en el crecimiento de algunas especies bacterianas de los géneros *Neisseria* spp., *Streptococcus* spp. y *Gardnerella* spp.

Como frecuentemente los hemocultivos se extraen en pacientes que están recibiendo tratamiento antibiótico, se emplean partículas de carbón o resinas para neutralizar el efecto de los mismos. Las resinas además están diseñadas para neutralizar los componentes de la cascada del complemento

presentes en la sangre. Algunos medios de crecimiento incorporan agentes líticos que favorecen la recuperación de microorganismos incluidos en interior de los fagocitos.

Aunque se ha cuestionado la utilidad de los frascos para anaerobios debido al bajo porcentaje de bacterias anaerobias estrictas responsables de bacteriemia, actualmente se siguen recomendando en adultos ya que su utilización ayuda a localizar el foco de la infección y además en este tipo de frascos se recupera más rápidamente un 10% de bacterias anaerobias facultativas. Esto es más discutible en población pediátrica ya que el riesgo de desarrollar bacteriemia por estos microorganismos es mucho menor que en la población adulta, lo que junto al escaso volumen de sangre del que se dispone en estos pacientes, hace que se recomiende cultivar toda la sangre en condiciones de aerobiosis a menos que el paciente presente una situación de riesgo elevado de infección por microorganismos anaerobios (sepsis de origen abdominal, de origen cutáneo asociada a mucositis oral, mordeduras, heridas por aplastamiento o úlceras sacras, sepsis nosocomial tras cirugía abdominal o traumatológica, sepsis con hipotensión refractaria, fiebre de origen dentario, infecciones crónicas como sinusitis, osteomielitis o pacientes inmunodeprimidos).

El método de lisis-centrifugación es la base del sistema Isolator (DuPont); consiste en un tubo que contiene saponina como agente lisante, polipropilenglicol como agente antiespumante, SPS y EDTA como anticoagulantes y un líquido fluoroquímico inerte. Tras la inoculación de la sangre, ésta se mezcla con el contenido del tubo para conseguir la lisis de las células. A continuación, para separar a los microorganismos y los elementos sanguíneos, se centrifuga el tubo a 3.000 x g durante 30 minutos. Después se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en distintos medios de cultivo. Se ha utilizado en el aislamiento de bacterias intracelulares como *Bartonella* spp. y de hongos, pero exige procesar la muestra de forma manual en los primeros 30 minutos y presenta una alta incidencia de contaminaciones; por otra parte, se ha mostrado inferior a los métodos clásicos en el aislamiento de *Haemophilus* spp., *S. pneumoniae* y bacterias anaerobias.

13. PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS HABITUALES

Los principales factores que pueden afectar a la positividad de los frascos de hemocultivo son además del volumen de sangre inoculado, la administración de antimicrobianos previa a su extracción, la atmósfera de incubación elegida, el retraso en la incubación y la duración de la misma.

El 85-90% de los hemocultivos son positivos en menos de 48 horas salvo en el caso de que se trate de una fungemia o de una bacteriemia causada por una bacteria de crecimiento lento. En general, los frascos se incuban 5 días antes de informarse como negativos. Este tiempo es generalmente suficiente para la recuperación de la mayoría de los microorganismos, incluidas las bacterias exigentes del grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella* spp. y *Kingella* spp.) y *Brucella* spp., y se debe prolongar en aquellas patologías como la endocarditis que pueden estar causadas por bacterias de crecimiento lento o cuando se sospeche la presencia de hongos, micobacterias, *Legionella* spp., *Brucella* spp., *Bartonella* spp. o *Nocardia* spp. Hay que tener en cuenta que la prolongación del tiempo de incubación favorece la recuperación de contaminantes por lo que los hallazgos tardíos deben valorarse con mucha precaución.

14. AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON REQUERIMIENTOS ESPECIALES

Si la colaboración entre el profesional clínico y el microbiólogo es siempre necesaria, mucho más lo debe ser ante la sospecha de una infección cuyo agente etiológico es de difícil aislamiento y crecimiento. La mayoría de estas bacterias necesitan medios de cultivo especiales por sus requerimientos nutritivos y, en algunos casos, su incubación debe ser prolongada debido a su lento crecimiento. En alguno de estos procesos infecciosos el estudio serológico y las técnicas de microbiología molecular son procedimientos indispensables para el diagnóstico.

14.1.- BRUCELOSIS

La incidencia de esta patología ha descendido de forma sustancial en los últimos años por las medidas de control veterinario y de alimentos que se han ido poniendo en práctica. No obstante, se debe tener en cuenta su posible aislamiento a la hora de procesar un hemocultivo positivo, especialmente si el paciente tiene anticuerpos frente a este patógeno, dato que debe ser incluido siempre en la petición si la información es conocida por el médico responsable del paciente. Se considera un potencial agente de bioterrorismo y debido al riesgo que representa para el personal del laboratorio, se exige un nivel 2 de seguridad para procesar muestras con sospecha de contener este patógeno y un nivel 3 para manipular los cultivos que puedan contenerlo (sospecha clínica y visualización en la tinción de Gram de cocobacilos gramnegativos/variables, oxidasa positivos). Esta tinción puede mejorarse utilizando fucsina como colorante de contraste en lugar de safranina.

Para el aislamiento de *Brucella* spp. se ha utilizado clásicamente el medio de cultivo de Ruiz Castañeda pero actualmente los frascos aerobios de los sistemas automáticos detectan correctamente el patógeno si se inocula un volumen de sangre adecuado en un tiempo comprendido entre 3 y 5 días (95% de los casos de infección aguda). Sin embargo, cuando existe sospecha de brucelosis, antes de considerar el hemocultivo como negativo se recomienda prolongar el período de incubación hasta 21 días e incluso realizar un subcultivo ciego del frasco negativo en medios sólidos adecuados para el aislamiento de este patógeno.

14.2. TULAREMIA

El aislamiento de *Francisella tularensis* en el hemocultivo es muy poco frecuente ya que la bacteria sólo está en la sangre en la fase aguda de la enfermedad, por lo que generalmente el diagnóstico de tularemia se suele realizar a través del estudio serológico. Este microorganismo puede crecer en los sistemas comerciales pero los frascos deben incubarse al menos 14 días, realizando un subcultivo cada 4 días y al final del período de incubación en agar sangre suplementada con glucosa y cisteína. También se pueden utilizar agar chocolate enrique-

cido con IsoVitalax o agar charcoal con extracto de levadura. Los niveles de seguridad requeridos son los mismos que los descritos para *Brucella* spp. Es un potencial agente de bioterrorismo y se debe manipular con un nivel 3 de bioseguridad.

14.3. *Leptospira* spp.

Ante la sospecha clínica, las muestras de sangre deberían obtenerse durante la primera semana de la enfermedad, puesto que la bacteriemia no perdura más de 7 días tras la infección aguda producida por espiroquetas del género *Leptospira* spp. Durante este periodo, la carga bacteriana puede ser muy elevada, de hasta 10^6 bacterias/ml de sangre, no detectándose todavía la presencia de anticuerpos específicos.

Este microorganismo no sobrevive a 35°C, por lo que debe incubarse a 28°-30°C, en oscuridad, durante un máximo de 13 semanas. No se recomienda el examen directo de la sangre en campo oscuro. Lo ideal es inocular dos gotas de sangre en 10 ml de un medio semisólido que contenga albúmina y ácido oleico como el medio de Ellinghausen-McCullough, el caldo Johnson-Harris o el caldo PLM-5 en la misma cabecera del enfermo y examinar una vez a la semana mediante microscopía de campo oscuro con objeto de detectar la presencia de formas espiroquetales móviles. Alternativamente, la sangre se puede recoger en tubos con heparina, oxalato o citrato que deberán ser transportados a temperatura ambiente para su cultivo en un laboratorio de referencia.

Se ha observado que este microorganismo puede sobrevivir entre 48 horas y 4 semanas en frascos de hemocultivos comerciales por lo que, en caso de sospecha clínica, se pueden utilizar éstos como inóculo de los medios específicos para su aislamiento.

14.4. *Bartonella* spp.

Son bacilos gramnegativos muy pequeños, ligeramente curvados y de difícil aislamiento. *B. henselae* y *B. quintana* se han descrito como agentes responsables de El sobre todo en vagabundos, en pacientes con enfermedad granulomatosa, peliosis, enfermedad por arañazo de gato y síndromes neurológicos en pacientes portadores del VIH. Existen zonas endémicas por lo que constituyen una amenaza para los viajeros.

Se ha obtenido crecimiento de *Bartonella* spp. en líneas de cultivo celular HeLa, células endoteliales y/o en cultivo primario de monocitos humanos aunque generalmente el diagnóstico de la infección por *Bartonella* spp. se realiza mediante una técnica de detección de anticuerpos. Actualmente, las técnicas de microbiología molecular a partir de sangre o de válvula cardiaca aparecen como las más prometedoras, aunque todavía no están suficientemente implementadas en todos los Servicios de Microbiología Clínica.

Se puede intentar su aislamiento utilizando una técnica de lisis-centrifugación (bien a partir de sangre directa o del hemocultivo positivo) y subcultivo del sedimento en placas de agar sangre, chocolate o BCYE incubadas a 35°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 14-21 días. *Bartonella bacilliformis*, a diferencia de *B. henselae* y *B. quintana*, crece mejor a 25-30°C. Los sistemas automáticos no detectan la presencia de este microorganismo por lo que hay que realizar subcultivos ciegos de los frascos a partir del séptimo día, incluyendo una tinción de naranja de acridina.

14.5. *Legionella* spp.

Legionella spp. requiere para su crecimiento el medio BCYE y se puede recuperar inoculando el medio a partir de un hemocultivo habitual incubado durante 5 días o a partir de un sistema de lisis centrifugación.

14.6. BACTERIAS DEFICIENTES EN PARED

Mycoplasma hominis y *Ureaplasma urealyticum* se han relacionado con sepsis posparto, postaborto o tras cirugía ginecológica; suelen ser bacteriemias transitorias y autolimitadas que evolucionan bien, incluso sin tratamiento específico. Los sistemas estandarizados de hemocultivos pueden no ser, en ocasiones, capaces de favorecer por sí solos el aislamiento de este tipo de microorganismos sin la adición de arginina y gelatina que neutralice el efecto del SPS. Estos microorganismos crecen mejor en el frasco anaerobio y es característico que el sistema detecte positividad y no se observen microorganismos en la tinción de Gram. En estos casos hay que realizar un subcultivo en medio específico como el Shepard A-7 o SP4 bifásico e incubar durante 7 días a 35°C en atmósfera anaerobia para

visualizar en el examen microscópico las colonias características de estos géneros; también se puede realizar la tinción de Dienes.

Mycoplasma pneumoniae también se ha asociado a cuadros de bacteriemia en diferentes tipos de pacientes pero no se recupera a partir del hemocultivo sino de alguna de las líneas de cultivo celular usadas en virología. De todas formas, en estos momentos su diagnóstico se realiza a expensas de la combinación de técnicas serológicas y de biología molecular.

14.7. *Campylobacter* spp. y *Helicobacter* spp.

Varias especies de *Campylobacter* spp, incluyendo *C. jejuni*, *C. lari* y *C. fetus*, se pueden aislar ocasionalmente a partir de hemocultivos mediante el protocolo habitual de incubación de 5 días. El subcultivo a partir de estos frascos se debe hacer en placas de agar sangre o medios específicos para *Campylobacter* spp., incubando las placas en una atmósfera microaerofílica a 35-37°C durante 2-3 días. *Helicobacter cinaedi* y otras especies como *H. westmeadii* se han podido recuperar de hemocultivos de pacientes generalmente inmunocomprometidos tras 7 días de incubación, siendo necesaria para su visualización microscópica la tinción con naranja de acridina o la utilización de fucsina como colorante de contraste de la tinción de Gram en lugar de safranina.

14.8. *Tropheryma whipplei*

Este patógeno puede encontrarse en la sangre en la fase aguda de la enfermedad, aunque también puede estar en la sangre de portadores asintomáticos de algunas áreas geográficas como Senegal. Se diagnostica mediante detección del genoma por técnicas moleculares.

14.9. *Rickettsia* spp.

También pueden encontrarse estos organismos en sangre durante la fase aguda de la enfermedad y su detección debe realizarse por técnicas moleculares y serológicas.

14.10. COCOS GRAMPOSITIVOS CON REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES ESPECIALES.

Abiotrophia spp. y *Granulicatella* spp. crecen bien en los frascos de hemocultivo. En la tinción de Gram se observan cocos grampositivos con tendencia a agruparse en cadenas, aunque a menudo su morfología es deforme, mostrando un aspecto cocobacilar incluso Gram-variable. La dificultad de su aislamiento estriba en que no crecen en agar sangre ni en agar chocolate, siendo necesario realizar el subcultivo en placas de agar sangre enriquecida con vitamina B₆ (en forma de piridoxal, no como piridoxina ni como piridoxamina) o con cisteína. Una forma sencilla de demostrar su deficiencia nutricional es realizando una estría con una cepa de *S. aureus* productor de beta-hemólisis en una placa de agar sangre y observando a las 24-48 h la presencia de crecimiento de microcolonias haciendo satelitismo alrededor de la estría. Pueden cultivarse utilizando discos impregnados en piridoxal en una placa de agar sangre. Estas bacterias suelen crecer también en los medios de cultivo empleados para el crecimiento de anae-robios, los cuales suelen ser más ricos en nutrientes.

14.11. *Treponema pallidum*

Puede detectarse en sangre la presencia de este patógeno por métodos moleculares en algunas fases de la enfermedad.

14.12.- MICOBACTERIAS

La infección diseminada por estos microorganismos adquirió importancia con el aumento de la prevalencia del SIDA, de modo paralelo a las mejoras en los métodos de detección y al aumento de la sensibilidad de los sistemas de cultivo, que incrementan la capacidad de detección de estos microorganismos (*Mycobacterium tuberculosis complex* o micobacterias no tuberculosas) en sangre. Un meta-análisis publicado recientemente en el que se pretende establecer la prevalencia de bacteriemia por *M. tuberculosis* en pacientes adultos y pediátricos describe que entre los adultos infectados por el VIH que viven en áreas donde la tuberculosis es endémica, *M. tuberculosis* es una causa frecuente de infección diseminada y afirma que, aunque los

niños tienen una mayor propensión a sufrir cuadros diseminados por *M. tuberculosis*, las bacteriemias son infrecuentemente descritas en éstos.

Las micobacterias pueden recuperarse en los sistemas de hemocultivos habituales utilizando frascos específicos que contienen ácidos grasos necesarios para su crecimiento y antimicrobianos para la prevención de contaminaciones mediante incubaciones prolongadas (42 días). También se ha mostrado útil el sistema de lisis centrifugación.

15. AISLAMIENTO DE HONGOS

Las levaduras del género *Candida* son las responsables de la mayoría de las fungemias. Clásicamente, *C. albicans* era la especie con más importancia clínica pero cada día se aíslan con mayor frecuencia otras especies de este género.

Las levaduras crecen bien en los frascos de hemocultivo habituales a pesar de lo cual esta prueba sólo es positiva en aproximadamente la mitad de los pacientes en los que se sospecha fungemia debido a que los monocitos y otras células del sistema inmunológico lisan las células fúngicas, puede haber un inóculo muy bajo o las fungemias pueden ser transitorias o intermitentes. Para mejorar la sensibilidad de la técnica, el volumen de sangre cultivado es un factor crucial. Un aspecto controvertido es la utilidad de realizar una extracción adicional de un frasco específico para hongos, aunque algunos autores han comunicado que mejoran los porcentajes de recuperación especialmente para infecciones asociadas a *C. glabrata*.

En relación con el tiempo de incubación de los frascos de hemocultivos con sospecha de infección fúngica por levaduras, hay varios estudios que comunican que la gran mayoría de estos microorganismos se aíslan en los primeros tres días de incubación siendo *C. glabrata* y *Cryptococcus neoformans* los patógenos que tienen crecimiento más lento. De todas formas debido a la baja rentabilidad de este método diagnóstico en este proceso, se aconseja ampliar el tiempo de incubación de estos frascos si tras 5 días permanecen negativos y la sospecha clínica de fungemia es elevada.

Mientras que la temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de las levaduras es 37°C, los hongos

filamentosos crecen mejor a temperaturas más bajas (27-30°C), y si se añade que en la sangre hay pocas células fúngicas en infecciones invasoras producidas por hongos filamentosos, raramente se van a aislar éstos en los frascos aerobios de hemocultivo convencional. Además, su aislamiento muchas veces es cuestionable clínicamente por la posibilidad de que sea una contaminación ambiental del frasco.

Si se sospecha que el agente causal es un hongo dimórfico o filamentosos es recomendable prolongar la incubación del hemocultivo hasta 30 días a 22-30°C y realizar un subcultivo final antes de descartarlo como negativo. En estos casos se deben emplear sistemas alternativos como la lisis-centrifugación, que ha demostrado una gran eficacia para recuperar hongos, especialmente *Histoplasma capsulatum*. En el caso de especies muy lipofílicas como *Malassezia furfur* puede ser necesario suplementar el medio con aceite de oliva.

Debido a la dificultad diagnóstica de estas infecciones a través del cultivo de la sangre y otras muestras, se han desarrollado sistemas alternativos como la detección de antígenos de la pared fúngica como el galactomanano y el (1→3)-beta-glucano o la detección de una glucoproteína extracelular de *Aspergillus* spp. mediante la técnica del lateral flow device (LFD). Como hay muy poco ADN fúngico circulante en la sangre de pacientes con micosis por hongos filamentosos, los sistemas de detección del genoma de estos patógenos tienen utilidad limitada y además es difícil su validación por la dificultad de tener un patrón de referencia adecuado. Recientemente se ha desarrollado un protocolo validado internacionalmente para la detección de *Aspergillus* spp. Se pueden consultar más datos en el Procedimiento Microbiología Clínica nº 45. Guinea J (coordinador), SEIMC 2012. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora.

16. AISLAMIENTO DE *Leishmania* spp.

La leishmaniasis es una parasitosis del sistema mononuclear fagocítico causada por *Leishmania donovani*. Su frecuencia aumentó en nuestro medio con la aparición del SIDA volviendo a disminuir con la aparición de pautas antiretrovirales eficaces. El diagnóstico requiere la demostración de la presencia de

Leishmania spp., ya sea por examen microscópico, realizando una tinción de Giemsa o por detección de su genoma a partir de las muestras obtenidas de médula ósea, de biopsia de bazo o de piel; la sangre periférica ofrece un rendimiento diagnóstico muy bajo. Otro abordaje diagnóstico es el cultivo en medio NNN que está suplementado con sangre desfibrinada de conejo; otros medios útiles son el medio *Drosophila* de Schneider suplementado con suero fetal bovino al 30% o el medio *Eagle minimal essential medium* suplementado también con suero fetal bovino. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 1 mes y se realiza un examen microscópico del medio al tercer día y una vez por semana. Los métodos de detección genómicos están empezando a revolucionar el diagnóstico de este patógeno, aunque todavía no disponemos de sistemas comerciales suficientemente validados.

17. PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS POSITIVOS

Los hemocultivos positivos se deben procesar en cuanto el sistema comunique su positividad. Cada laboratorio debe establecer los protocolos de trabajo para que dentro del horario del mismo se procesen de forma continuada y se informen de forma precoz los resultados disponibles.

Cuando se detecta un hemocultivo positivo se debe realizar lo antes posible un examen directo mediante tinción y un subcultivo en diferentes medios de cultivo intentándose, dado que generalmente son monomicrobianos, hacer la identificación y el antibiograma de forma directa e inmediata para disminuir el tiempo de emisión de resultados. Es muy recomendable que los hemocultivos se procesen e informen en los 3 turnos de trabajo del laboratorio durante los 7 días de la semana.

17.1. TINCIONES

La tinción más utilizada es la de Gram. La observación se realiza al microscopio óptico con 1.000 aumentos anotándose, además de la morfología y de si es grampositivo o gramnegativo, todas aquellas características que puedan contribuir a orientar la especie. La tinción de Gram es una herramienta clave para detectar la presencia de infecciones polimicrobianas.

17.2. SUBCULTIVOS

Los subcultivos se realizan independientemente del resultado del examen del Gram, incluso aunque no se observe ningún microorganismo en la tinción. Lo habitual es que unas gotas de la sangre extraída del frasco se inoculen en diferentes medios de cultivo. Siempre se debe inocular en agar sangre y/o agar chocolate y en función de la tinción de Gram se debe valorar la adición de otros medios. Con objeto de detectar fácilmente la presencia de infecciones polimicrobianas y facilitar la identificación rápida de los microorganismos implicados se recomienda la inclusión de placas selectivas para bacilos gramnegativos y para cocos grampositivos. Si hay sospecha de infección fúngica, por la tinción de Gram o por la sintomatología clínica del paciente, se debe incluir además una placa de agar Saboureaud o placas con medios cromogénicos para aislamiento e identificación rápida de levaduras. Las placas se incubarán a 37°C y las que contienen sangre en atmósfera con 5-10% de CO₂. Se deben revisar a las 24 h, manteniéndolas más tiempo si son negativas. Las placas con medios de cultivo para hongos pueden requerir incubación prolongada e incluso incubación a diferentes temperaturas (30° y 37°C).

La sangre procedente del frasco anaerobio, además de en estos mismos medios de cultivo, se sembrará en medios específicos para anaerobios que se incubarán en atmósfera adecuada. Hay que tener en cuenta que frecuentemente estas bacterias se detectan en procesos asociados a infecciones polimicrobianas por lo que se deben incluir placas selectivas que favorezcan el crecimiento de estos microorganismos y limiten el de las bacterias anaerobias facultativas. Los tiempos de incubación serán de 48 h como mínimo. La dificultad metodológica de este cultivo hace que la incidencia de bacterias anaerobias sea muy dispar entre los diferentes centros, variando entre un 0,5 y un 20%.

En aquellos casos en que no se logre ver microorganismos en el examen microscópico o no aparezca crecimiento visible en los subcultivos, las placas se deben incubar más tiempo (evitando la desecación de las mismas). También se deben revisar las tinciones y analizar las características clínicas del paciente con objeto de decidir los procedimientos a seguir, valorando la posibilidad de que el paciente

tenga una bacteriemia/fungemia causada por un microorganismo de crecimiento lento o con requerimientos especiales.

17.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación óptima de los resultados de los hemocultivos positivos requiere del conocimiento de la situación clínica del paciente, su enfermedad de base, los factores predisponentes a la infección y, a poder ser, de los tratamientos antimicrobianos que le han sido administrados. Ello obliga a revisar la historia clínica de los pacientes, más ahora que es fácilmente accesible mediante los sistemas informáticos, siendo muy recomendable que exista una estrecha comunicación con el facultativo responsable del paciente con objeto de informar de los hallazgos de forma precoz y valorar conjuntamente el proceso. Para ello, deben establecerse canales fluidos de comunicación utilizando los nuevos avances tecnológicos.

Un tema capital a la hora de establecer la importancia clínica de los hallazgos microbiológicos es lograr diferenciar entre contaminación e infección. El *National Healthcare Safety Network* (NHSN) de Estados Unidos define hemocultivo contaminado (falso positivo) como aquel en el que se aíslan especies propias de la microbiota comensal de la piel o propios del medio ambiente: estafilococos coagulasa negativa, otros microorganismos de baja o nula virulencia como *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *P. acnes*, la mayoría de las especies de los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium* y algunos estreptococos del grupo viridans. Sin embargo, antes de considerar un aislamiento de estos microorganismos como contaminante, hay que analizar detenidamente las características clínicas del paciente y el número de hemocultivos en los que se aíslan ya que, en algunos casos, estos microorganismos pueden estar implicados en bacteriemias; en caso de niños, esta diferenciación es particularmente difícil porque habitualmente sólo tienen una extracción y por tanto deben extremarse las medidas para evitar la contaminación de los frascos y en caso de duda, se podría volver a extraer otra muestra.

S. aureus, *S. pneumoniae*, enterobacterias, *P. aeruginosa* y *C. albicans* están casi siempre implicados en bacteriemias verdaderas; por el con-

trario, *Corynebacterium* spp. y *Propionibacterium* spp. suelen ser contaminantes. La recuperación de *Streptococcus* del grupo viridans, estafilococos coagulasa negativa y *Enterococcus* spp. tiene más difícil interpretación porque se ha comunicado que se asocian a verdadera bacteriemia en el 38 %, 15 % y 78 % de los casos, respectivamente.

Es muy recomendable que se conserven las cepas aisladas en hemocultivos en el cepario de cada hospital. Si esto no fuera técnicamente posible, al menos debe conservarse el vial positivo durante algunas semanas.

17.4. PREVENCIÓN DE LAS CONTAMINACIONES

Según la Guía IDSA del 2013, la contaminación de los hemocultivos se considera un indicador de la calidad asistencial y no debería sobrepasar el 3% de los hemocultivos totales recibidos en un laboratorio. Estas contaminaciones pueden llegar a representar hasta un tercio de los cultivos de sangre positivos y se ha visto que la tasa de contaminación se correlaciona inversamente con el volumen de sangre, de modo que un pequeño volumen de muestra podría aumentar la concentración de contaminantes y es un indicador de dificultad en el momento de la extracción de la muestra. También se ha correlacionado con el sitio de la punción y las dificultades del acceso venoso, de manera que la venopunción periférica se asocia a menor tasa de contaminaciones que el acceso arterial o los accesos venosos centrales. Algunos autores habían propuesto, en el caso de la venopunción, desechar el primer mililitro del hemocultivo para reducir la tasa de contaminación, aunque actualmente se ha visto que los argumentos que apoyaban esta recomendación no poseen evidencia científica.

Estas contaminaciones pueden suponer la administración innecesaria de antibióticos con las complicaciones derivadas de ello, la realización de pruebas diagnósticas innecesarias, el aumento de la estancia hospitalaria y en definitiva de los costes de hospitalización y perjuicios ocasionados al paciente. En estos casos el microbiólogo debe informar específicamente que se sospecha que este microorganismo es un contaminante y no debe realizar ni informar estudios de sensibilidad antibiótica.

Existen varios parámetros que pueden ayudar a identificar con precisión el significado de un hemocultivo positivo cuando la sintomatología clínica no es definitiva:

1. El número de extracciones positivas con respecto al total de extracciones efectuadas (no sólo botellas positivas sino que en el caso de que se hayan extraído dos botellas por hemocultivo, las dos sean positivas).
2. El sitio de toma de la muestra: catéter versus punción venosa.
3. El tiempo hasta la positividad, incluyendo el tiempo de diferencia de positividad entre pares recogidos en diferentes sitios. En lo que respecta a los estafilococos coagulasa negativa, un tiempo de ≤ 15 h generalmente indica que el microorganismo tiene valor clínico y si es de ≥ 22 h sugiere contaminación; para analizar este parámetro con exactitud, debe asegurarse un transporte rápido de los hemocultivos al Servicio de Microbiología.
4. La identidad del microorganismo, ya que la presencia de algunos microorganismos como *P. acnes* en el cultivo de sangre tiene pocas posibilidades de indicar bacteriemia verdadera, a menos que el paciente esté expuesto a un riesgo particular.

Cuando varios hemocultivos dan resultado positivo y no se tiene clara su significación clínica por el tipo de microorganismo aislado y el número de frascos positivos, es importante analizar los datos fenotípicos de identificación y del antibiograma, que si coinciden, sugieren, aunque no de forma rotunda, que la bacteria está presente en la sangre del paciente. La comparación genotípica de las cepas, que sería el método más útil, al demorarse en el tiempo y no estar disponible en la mayoría de los laboratorios, no tiene utilidad práctica. Probablemente, en un futuro próximo, el desarrollo de la secuenciación masiva puede ofrecer una oportunidad en este sentido. En esta situación deben tenerse muy en cuenta las características clínicas del paciente ya que estos microorganismos suelen ser causa de bacteriemia en pacientes con implantes endovasculares y otros tipos de prótesis y en aquellos que padecen neutropenia. Recientemente se están desarrollando modelos matemáticos para ayudar a la toma de decisiones, pero aún están en proceso de validación.

18. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

Los hemocultivos pueden tener un impacto inmediato en las decisiones clínicas que afectan al paciente, por lo que los resultados clínicamente relevantes se deben informar de forma preliminar desde el mismo momento en que se dispone del resultado de la tinción de Gram del hemocultivo positivo. Es útil revisar otros cultivos previos o coincidentes del mismo paciente, incluso de otras localizaciones, que puedan orientar en cuanto al origen de la bacteriemia/fungemia y la identificación del microorganismo. Ya se ha señalado que es importante tener en cuenta el número de frascos positivos, si estos pertenecen a una o varias extracciones, el tiempo de positividad y es fundamental la descripción del microorganismo que se ha visualizado en la tinción, así como el resultado de las técnicas rápidas disponibles que permitan disminuir el tiempo de emisión de resultados.

Si a las 48 horas de incubación no se detecta crecimiento se recomienda emitir un informe (generalmente automático) preliminar negativo. Al final del período de incubación deberán emitirse los informes negativos definitivos, indicando el número de días en que se incubó el hemocultivo. Por otra parte, cualquier comentario sobre la muestra o su manejo que pueda comprometer los resultados, como retrasos antes de la incubación de la botella en el instrumento o volúmenes subóptimos, deben agregarse al informe. Comentarios interpretativos como la probable significación clínica del aislado o información sobre el mecanismo de resistencia deben redactarse cuidadosamente, con un formato claro y fácil de interpretar, sin lugar a confusiones, para que cualquiera de los profesionales peticionarios comprendan este informe sin necesidad de tener grandes conocimientos microbiológicos.

Se ha demostrado repetidamente que la comunicación rápida de los resultados a grupos multidisciplinares que apliquen esa información al manejo del paciente de forma correcta hace que los resultados aportados desde el Servicio de Microbiología adquieran valor en el manejo clínico de estos procesos y mejoren su coste-eficacia; por tanto, es importante potenciar estos grupos en cada hospital y establecer cauces rápidos y eficaces de intercambio de información, utilizando todos los medios disponibles.

Los algoritmos y rutas de información y las personas o servicios a los que se debe informar varían según el centro. Además del empleo de los sistemas informáticos del hospital y el teléfono se pueden realizar reuniones diarias donde todos los profesionales implicados en el manejo del proceso intercambien información (microbiólogos, infectólogos, internistas, intensivistas, pediatras, preventivistas y equipo de control de la infección nosocomial fundamentalmente). Las nuevas herramientas de comunicación disponibles son muy prometedoras pero se debe recordar que la urgencia de la transmisión de la información no exime del cumplimiento de la Ley de Protección de Datos por lo que no se debe usar el nombre del paciente ni otra información sensible a terceros. Cuando se utilizan estas vías alternativas, el microbiólogo debe documentar y registrar este proceso en el sistema informático del laboratorio.

19. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO POR PROCEDIMIENTOS NO BASADOS EN EL CULTIVO: ASPECTOS GENERALES

El principal método de diagnóstico de una bacteriemia o fungemia indudablemente sigue siendo el hemocultivo, que tiene entre otras la importante ventaja de permitir aislar el microorganismo causante de la infección, realizar un antibiograma y si fuera necesario técnicas de tipado molecular. Sin embargo, tiene varios inconvenientes como son la demora diagnóstica, condicionada por el tiempo de incubación necesario para el aislamiento e identificación de cada microorganismo y los falsos negativos, debidos sobre todo al tratamiento antibiótico previo de los pacientes y en menor medida a una baja carga de microorganismos en sangre o la presencia de microorganismos exigentes que no crecen en los medios que contienen las botellas de hemocultivos. Otro inconveniente importante es que tiene una proporción variable de falsos positivos debidos sobre todo a la contaminación en la toma de muestras.

En el caso de la sepsis está demostrado que la evolución del paciente está condicionada por un diagnóstico etiológico rápido y la instauración precoz de un tratamiento antimicrobiano adecuado al agente causal. Por ello y por la gravedad de este tipo de infección en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos moleculares para la

identificación de bacterias y hongos directamente en muestras de sangre periférica o en los hemocultivos positivos. Estos métodos se suelen basar en la detección del ADN del microorganismo o bien en el perfil del espectro de masas de sus proteínas. Como están apareciendo en el mercado de forma exponencial sólo pretendemos describir los que han sido más evaluados en la literatura científica. Se pueden clasificar en tres grandes grupos:

19.1. SEROLOGÍA

La detección de anticuerpos sólo es útil en el diagnóstico etiológico de algunos procesos en los que el microorganismo no se puede cultivar o requiere procedimientos lentos y costosos (*Bartonella* spp. *Leptospira* spp., etc.). Estos métodos tienen como inconveniente que en la fase aguda del proceso puede no detectarse la presencia de anticuerpos en el suero del paciente, por lo que se están empezando a sustituir por técnicas de detección del genoma.

19.2. TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En general, la mayoría de los métodos recomiendan la recogida de sangre periférica en tubos con EDTA. No se deben admitir muestras extraídas a través de catéteres porque se podrían detectar microorganismos colonizadores. No son admisibles las muestras enviadas en tubos con heparina ya que en general inhibe las reacciones de amplificación.

Las muestras deben cumplir las normas generales de calidad (etiquetado, identificación del paciente, etc.) seguidas en cada laboratorio y una vez extraídas deben enviarse lo antes posible al Servicio de Microbiología. En general, si las muestras no se van a procesar inmediatamente se pueden conservar refrigeradas a 4°C (el menor tiempo posible) y si el análisis se va a demorar algunos métodos permiten que se conserven congeladas a -20°C o -70°C. En este último caso no deben experimentar ciclos de congelación y descongelación pero siempre hay que seguir las recomendaciones del fabricante en relación con el transporte y conservación. Si hay suficiente muestra se debería conservar una alícuota por si es necesario realizar estudios posteriores; asimismo, es conveniente conservar congelada una alícuota del ADN extraído.

Al tratarse de métodos de amplificación de ADN, en general muy sensibles, se deben seguir las precauciones de trabajo de los laboratorios de Microbiología Molecular para evitar contaminaciones. Se deben elegir métodos moleculares que cuenten con control interno de amplificación, controles positivos y negativos.

La ventaja de estas técnicas, además de la rapidez, es que son de gran ayuda cuando se trata de microorganismos no cultivables o de difícil crecimiento y cuando la toma de muestras se realiza después de instaurado el tratamiento antimicrobiano. Además, algunas permiten ofrecer información sobre la etiología del proceso y aportar información sobre la sensibilidad antibiótica del patógeno implicado mediante la detección de algunos determinantes de resistencia. En contrapartida son caras y necesitan una interpretación experta ya que miden la ADNemia en lugar de la bacteriemia y pueden poner de manifiesto ADN de bacterias no viables. Se ha de tener en cuenta que la sangre posee una gran cantidad de ADN humano respecto al bacteriano y puede presentar sustancias inhibitoras habituales (hemoglobina, heparina, etc.) que afecten a la eficacia de la reacción produciendo tanto resultados inválidos (por inhibición del enzima) como resultados falsamente negativos.

19.3. TÉCNICAS BASADAS EN EL ESTUDIO DEL PROTEOMA BACTERIANO/FÚNGICO

La aplicación de la espectrometría de masas (*MALDI-TOF*, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) a la Microbiología Clínica ha supuesto una revolución en los protocolos de trabajo en los centros que disponen de esta tecnología. Clásicamente, el único método rápido disponible para conocer la etiología del proceso era la tinción de Gram, que ofrecía una información útil pero frecuentemente parcial y obligaba a la utilización de coberturas antibióticas amplias hasta que se disponía de la información completa, tanto de la etiología del proceso como de la sensibilidad antibiótica del microorganismo implicado. Esto se paliaba en parte con la utilización de algunas pruebas de detección del genoma bacteriano que ofrecía información sobre etiología y resistencia antibiótica en algunos casos (*S. aureus* resistente a la meticilina, por ejemplo).

La nueva tecnología ofrece información sobre la etiología de forma precoz, pocos minutos después de realizarse la tinción de Gram y, por tanto, permite un ajuste precoz de la terapia antimicrobiana, especialmente si se dispone de la epidemiología local de la resistencia antibiótica en cada centro. La gran mayoría de los hospitales terciarios disponen ya de esta tecnología y debido a su gran utilidad se debe establecer una red de envío de muestras entre hospitales para que todos los enfermos puedan beneficiarse de este importante avance tecnológico.

20. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS EN FUNCIÓN DE LA MUESTRA PROCESADA

Existen dos grupos de técnicas: el primero está formado por aquellas que se aplican sobre frascos de hemocultivos positivos, con objeto de ofrecer información de forma más rápida que los métodos tradicionales basados en el cultivo. Estas técnicas están cada vez más extendidas por su gran utilidad en la práctica clínica habitual y su gran correlación con los métodos clásicos. Un segundo grupo de técnicas está formado por aquellas que se aplican directamente a partir de la sangre del paciente, con objeto de ofrecer información aún más precoz. Estas técnicas están mucho menos validadas y por tanto se utilizan mucho menos en la práctica clínica habitual.

20.1. TÉCNICAS DESTINADAS AL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO APLICABLES SOBRE HEMOCULTIVOS POSITIVOS

Estas técnicas se aplican sobre los microorganismos presentes en los frascos de hemocultivos positivos y son complementarias de los métodos clásicos de identificación, pero permiten ofrecer una información más rápida a la aportada por los métodos fenotípicos clásicos.

Muchas de estas técnicas (Tabla 2) ofrecen además información sobre la sensibilidad del microorganismo implicado porque detectan la presencia de genes de resistencia antibiótica y se describirán en el apartado correspondiente.

20.1.1. Técnicas de amplificación

Entre los sistemas que sólo detectan la presencia de determinados microorganismos sin analizar la resistencia antibiótica, los que tienen más utilidad clínica son:

- AccuProbe system (Gen-Probe) utiliza sondas para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. y *Streptococcus* de los grupos A y B.
- GenomEra *S. pneumoniae* y GenomEra *S. aureus*: detectan con excelente sensibilidad y especificidad estos patógenos a partir de frascos positivos. En el caso de *S. aureus*, también detecta la resistencia a la meticilina.

20.1.2. Técnicas de hibridación in situ con sondas fluorescentes

La tecnología FISH (*fluorescence in situ hybridization*) se está aplicando a la detección de microorganismos presentes en hemocultivo positivo, pero presentan la importante limitación de que sólo pueden detectar la presencia de pocas especies de microorganismos ya que hacen falta sondas específicas de cada uno y además se necesita un instrumental complejo y no disponible en muchos centros. La más utilizada es la técnica denominada PNA-FISH (*Pathogen-Specific Methods Peptide nucleic acid, AdvanDx*), es el sistema comercial más desarrollado, y utiliza sondas fluorescentes específicas de cada patógeno que se unen a los genes 16S rARN de las bacterias y 26S rARN en levaduras. Están aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) y están disponibles sondas para *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativa, *E. faecalis*, otros *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. También detecta la presencia de levaduras, de las especies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*.

20.1.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Su aplicación ha supuesto un gran avance en muchos ámbitos de la Microbiología Clínica debido a su rapidez y fiabilidad para identificar microorganismos. Su uso en el diagnóstico rápido de las bacteriemias y fungemias es particularmente útil debido a la gravedad de estos procesos. Sin embargo, la aplicación de MALDI-TOF sobre muestras de hemocultivos positivos en pacientes con bacte-

riemia o fungemia es uno de los escenarios más complicados desde el punto de vista técnico ya que presenta más dificultades que cuando se aplica directamente sobre bacterias aisladas en medios de cultivo sólidos a causa de la baja carga microbiana y de la alteración de los espectros proteicos bacterianos por interferencias con el medio por la presencia de proteínas humanas, células sanguíneas y carbón en el frasco de hemocultivo.

Debido a estas limitaciones no existe un único protocolo establecido y validado sobre el modo de procesar estas muestras. En general, los procedimientos tratan de eliminar sustancias que interfieren en el proceso y concentrar las bacterias, generalmente mediante centrifugación. Hay un sistema comercial de procesamiento de estas muestras (Bruker Sepsityper) que facilita el proceso y ofrece buenos resultados. Otro abordaje es la amplificación de la carga bacteriana mediante subcultivos en medios sólidos de 3-4 horas, útil especialmente para cocos gram-positivos, bacterias que más problemas de identificación proporcionan.

Otra limitación del procedimiento es la posible presencia de patógenos no incluidos en la base de datos. En las nuevas versiones se va mejorando el análisis bioinformático de los espectros proteicos y se amplía su cobertura. Existen 3 sistemas comercializados; Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics), VITEK MS IVD (BioMérieux) y MALDI microMX (Waters Corporation): estudios comparativos de los dos primeros muestran que ambos logran identificar los patógenos asociados a infecciones monomicrobianas en más del 90% de los casos.

El aspecto más problemático técnicamente es la identificación de cocos grampositivos. Existen muchos estudios que muestran protocolos y resultados muy discrepantes tanto en sensibilidad como en especificidad en función de los procedimientos empleados y de los criterios establecidos para considerar una identificación como correcta. La fiabilidad de la identificación de *S. pneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis* es cuestionable, ya que frecuentemente estos se identifican erróneamente como *S. pneumoniae*. La identificación correcta de las enterobacterias se realiza en la práctica totalidad de los casos. La capacidad de MALDI-TOF para la correcta identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores es algo menor. De la misma forma, es muy útil para identificar levaduras directamente en el hemocultivo.

Esta técnica es especialmente útil en la identificación de microorganismos de cultivo difícil o lento (bacterias anaerobias, *Actinomycetales*, bacilos gramnegativos de crecimiento lento, etc.) ya que supera problemas existentes en los protocolos clásicos, siempre que estos estén incluidos en la base de datos del sistema. También ha mostrado gran utilidad en la identificación rápida de bacterias con gran patogenicidad como *Bacillus anthracis*, *Bruceella melitensis*, *Francisella tularensis* o *Yersinia pestis* y se han desarrollado protocolos específicos de bioseguridad. Por el contrario, presenta muchas limitaciones en la identificación de bacteriemias poli-microbianas, aunque hay diferencias en función de los procedimientos empleados. Actualmente se ha perfeccionado el análisis bioinformático de perfiles proteicos mixtos y ofrece mejores resultados.

Recientemente, esta técnica se está empezando a emplear en el estudio de la sensibilidad antibiótica de los microorganismos pero los procedimientos no están suficientemente validados para su aplicación clínica: el sistema MALDI-TOF predice en menos de 3 h si las bacterias producen enzimas que hidrolizan los antibióticos, como por ejemplo carbapenemasas y beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante incubación conjunta de la bacteria y el antibiótico diana de los enzimas. Si el microorganismo posee la enzima que degrada el antibiótico se observará la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la hidrólisis del antibiótico. Otro abordaje es la detección de picos específicos de determinados mecanismos de resistencia, así, *S. aureus* resistente a meticilina presenta picos de identificación específicos. De la misma manera, también detecta la presencia de *E. faecium* resistentes a vancomicina. También es posible estudiar la sensibilidad a los antibióticos mediante la incubación de microorganismos en presencia de antibiótico en un medio con moléculas marcadas con isótopos. Si el microorganismo es resistente, este incorporará las moléculas marcadas que podrán ser detectadas también por la presencia de picos específicos.

20.1.4.- Técnicas inmunocromatográficas y otras técnicas rápidas

BinaxNOW es un método inmunocromatográfico que detecta la presencia de *S. pneumoniae* a partir de frascos de hemocultivo positivos con excelente

sensibilidad, pero tiene problemas de especificidad (aproximadamente 70% de especificidad). Existen otros sistemas basados en aglutinación en latex; ImmuLex *S. pneumoniae* Omni (*Statens Serum Institut*), Slidex pneumoKit (BioMérieux) y Wellco-gen *S. pneumoniae* (Remel) pero no han logrado soslayar este problema y aún están en fase de evaluación en hemocultivos.

21. TÉCNICAS DESTINADAS AL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO APLICABLES DIRECTAMENTE SOBRE LA SANGRE DEL PACIENTE

La detección de microorganismos mediante métodos moleculares directamente en la sangre del paciente, sin necesidad de incubación previa, tiene el interés de acelerar la identificación tanto del microorganismo como de algunos genes asociados a resistencia al no requerir el cultivo.

El diseño de métodos moleculares que utilizan la sangre periférica para el diagnóstico de bacteriemia/fungemia plantea varios problemas: la baja carga de microorganismos en sangre (hasta 1-10 bacterias/ml de sangre), la variedad de microorganismos diferentes que pueden causar esta patología y la presencia de inhibidores en las muestras de sangre (por ejemplo la elevada proporción de ADN humano respecto al ADN microbiano). Estas limitaciones condicionan que la sensibilidad de estos métodos no sea óptima y no permita descartar la infección en caso de resultados negativos, sobre todo porque la mayoría de los métodos detectan un número limitado de microorganismos. Además, la cantidad de muestra que se analiza en estos métodos es mucho menor (entre 1-5 ml) que la inoculada en los hemocultivos lo que contribuye a la baja sensibilidad. Otra limitación importante es la elevada cantidad de genoma humano que puede interferir con los cebadores y la existencia de sustancias inhibitorias del proceso de amplificación como hierro, inmunoglobulinas, hemoglobina y heparina.

Hay que tener en cuenta que la determinación de la carga bacteriana presente se realiza por métodos de cultivo y esto no necesariamente corresponde con la carga de ADN presente en la sangre; así, a la hora de analizar la sensibilidad de las técnicas moleculares es mejor considerar el número de copias genómicas de un microorganismo presentes en una muestra. Este concepto también tendría

en consideración el ADN de bacterias muertas o las capturadas por células fagocíticas circulantes. De acuerdo con esta opción, se estima que en un episodio de bacteriemia el número de copias genéticas circulantes sería entre 10^3 y 10^4 copias de ADN/ml de sangre, valor estaría por encima del límite de detección de la mayoría de las técnicas de amplificación.

Considerando lo anterior, este tipo de técnicas diagnósticas deben aportar: un bajo límite de detección que permita una elevada sensibilidad analítica, un amplio abanico de microorganismos a detectar (sobre todo los más frecuentes) y un diseño que evite las contaminaciones que den lugar a falsos positivos, así como las inhibiciones que producen falsos negativos o resultados no interpretables. Estos objetivos implicarán tanto a la parte de extracción del ADN microbiano como a la técnica de amplificación y detección del ADN. Por otra parte, es importante que los métodos sean fáciles de realizar e interpretar por el personal del Servicio de Microbiología Clínica, ya que al ser determinaciones urgentes se deberían realizar en todos los turnos de trabajo.

Para tener una mayor utilidad real estos métodos no sólo deben identificar el microorganismo presente en la muestra de sangre sino también detectar mecanismos de resistencia que puedan ayudar a decidir un cambio de tratamiento (resistencia a la meticilina en *S. aureus* o determinantes de multiresistencia en enterobacterias), aspectos que serán tanto más importantes en entornos con alta prevalencia de microorganismos multiresistentes.

Estos métodos pueden además permitir identificar microorganismos exigentes que no crecen en el hemocultivo convencional (*Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., etc.) así como detectar los microorganismos inhibidos por el tratamiento antibiótico del paciente antes de la toma de hemocultivos, ya que el ADN del microorganismo puede permanecer en sangre por un tiempo a pesar de que los microorganismos no sean viables o puede detectarse de manera transitoria dentro de los fagocitos.

En este sentido, un aspecto importante a considerar en estos métodos es que realmente se está detectando ADNemia y no bacterias viables, con lo que los resultados de los métodos moleculares no son equivalentes totalmente a los hemocultivos, siendo difícil de interpretar la detección del ADN de un microorganismo en la sangre de un paciente

en ausencia de hemocultivos positivos, sobre todo teniendo en cuenta que estos sistemas pueden amplificar también bacterias contaminantes inoculadas en la sangre en el momento de la extracción o en su procesamiento posterior. Algunos autores consideran que la persistencia del ADN de un microorganismo en la sangre de un paciente en tratamiento antibiótico es indicativo de bacteriemia/fungemia complicada, incluso en ausencia de crecimiento antimicrobiano. Hasta ahora, estos métodos no suelen ser cuantitativos ya que no se sabe que significado puede tener una alta carga de ADN microbiano en sangre. En este aspecto hay estudios que correlacionan una mayor carga de ADN con mayor severidad de la infección e incluso peor pronóstico del paciente.

En general, estas técnicas suelen ser caras y no están muy introducidas en los Servicios de Microbiología Clínica asistencial, aunque existen artículos que demuestran su utilidad en el manejo del paciente y en la reducción de costes hospitalarios, sobre todo cuando se asocian a programas de optimización del uso de antimicrobianos y se informan de forma urgente, permitiendo la adecuación del tratamiento antibiótico, con la consiguiente mejora del manejo del paciente o el beneficio económico o ecológico asociado al mejor uso de los antimicrobianos. Es previsible que en un futuro próximo se diseñen nuevos métodos que resuelvan los problemas de los actuales, sobre todo considerando el avance que se está produciendo en las técnicas de secuenciación masiva y la nanotecnología. Sin embargo, es difícil de realizar su validación por la ausencia de un patrón de referencia adecuado ya que el cultivo puede tener frecuentes falsos negativos. Los más desarrollados y evaluados son:

- Light Cyler Septifast (Roche diagnostics): este método fue uno de los primeros en comercializarse y es con el que más trabajos se han publicado. Es un método basado en la amplificación por PCR a tiempo real de las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) del ADN ribosomal de bacterias y hongos. Su fundamento es la combinación de varias realtime PCR con sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y detecta la presencia de los patógenos analizando las curvas de melting. Detecta 25 especies de las bacterias más frecuentes causantes de bacteriemia, tanto grampositivas (*S. aureus* y estafilococos coagulasa negativa, *S. pneumoniae*, varias especies de *Streptococcus* spp., *E. faecalis* y *E. faecium*) como

gramnegativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*/*K. oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*/*E. aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*). También detecta 5 especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*) y *Aspergillus fumigatus*. La extracción del ADN de la muestra de sangre con EDTA (1,5 ml) se realiza en un extractor automático tras lisis con bolas de cerámica. Se preparan simultáneamente 3 PCRs multiplex para bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos. Los resultados se obtienen en unas 5-6 horas. Es un método que requiere experiencia en el manejo de técnicas moleculares para evitar contaminaciones y un laboratorio adecuado. Tiene una sensibilidad analítica entre 3-30 ufc/ml en bacterias y 100 ufc/ml para hongos. Este método es cualitativo pero en el caso de detectar estafilococos coagulasa negativa o *Streptococcus* spp. aplica un algoritmo semicuantativo para reducir la detección de contaminantes (se considera positivo si se detectan más de 100 ufc/ml). Este método puede detectar infecciones mixtas.

Se han publicado numerosos trabajos incluyendo estudios multicéntricos, metanálisis, revisiones sistemáticas y un ensayo clínico, con distintos estándares de comparación y en distintas poblaciones demostrando resultados de sensibilidad y especificidad muy variables, con una correlación con el hemocultivo de entre el 43-83%.

SepsiTest (Molzym GmbH): utiliza cebadores de amplio espectro frente al gen bacteriano 16S rDNA y al gen fúngico 18S rDNA en un sistema de PCR a tiempo real. En las muestras positivas la identificación se realiza por secuenciación de los amplicones obtenidos. El ensayo incluye reactivos libres de ADN y un método de extracción que degrada el ADN humano en la muestra y el ADN bacteriano libre, con lo que en teoría sólo se detectarían microorganismos viables.

Según el fabricante puede detectar más de 345 especies bacterianas y fúngicas diferentes con una sensibilidad analítica entre 20-460 ufc/ml. Se parte de 1 ml de sangre con EDTA y se recomienda realizar la prueba por duplicado. Recientemente se ha introducido una versión que analiza 10 ml de sangre para aumentar la sensibilidad. La extracción de ADN en las primeras

versiones era manual y muy laboriosa pero en los últimos años se ha adaptado a un extractor automático. La PCR se completa en unas 4 h, pero si las muestras son positivas tiene que realizarse la secuenciación y alineamiento de secuencias, que según los turnos de trabajo puede requerir entre 8-12 h más. Es un método laborioso, que requiere experiencia y laboratorios de biología molecular. No detecta marcadores de resistencia.

Este método ha sido evaluado en pocos estudios y se ha comunicado una sensibilidad de 87% y una especificidad del 86% con respecto al hemocultivo. La principal desventaja de este método es su laboriosidad junto con el requerimiento de un secuenciador de ácidos nucleicos. Su principal ventaja es el amplio número de microorganismos que teóricamente puede detectar y la degradación del ADN humano que hace la técnica más sensible.

- T2MR (T2 Biosystems) es un nuevo sistema sustentado en una nanotecnología basada en la resonancia magnética que detecta la presencia de varias especies del género *Candida*. Tras la lisis de las levaduras se amplifica el gen del espaciador fúngico ITS2, región encuadrada en el operon ribosomal; el amplicon se detecta mediante hibridación con nanopartículas magnéticas que son detectadas por resonancia magnética. Detecta la presencia de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Se obtienen resultados al cabo de 3-5 horas y el límite de detección de la técnica se sitúa entre 1 y 3 levaduras/ml. Está aprobada por la FDA, es totalmente automática y tiene elevada especificidad y sensibilidad. El aparato de resonancia magnética, llamado TD2x, puede ser empleado para otras aplicaciones. Emplea 4 ml de muestra de sangre con EDTA.

En lo referente a la utilidad de este método se han publicado sobre todo estudios de validación de laboratorio, comparando muestras preparadas con los resultados de los hemocultivos y los resultados preliminares muestran una sensibilidad del 99% y una especificidad del 91%. Lo más importante de esta prueba es, además de su facilidad de realización, el alto valor predictivo negativo que puede tener y que permitiría, si se demuestra en los estudios en curso, la retirada de tratamiento antifúngico. Los verdaderos positivos permitirían una adecuación del tratamiento y además de

mejorar el manejo del paciente podrían suponer una reducción del gasto en antifúngicos.

- T2 Biosystems está desarrollando un panel de detección de bacterias en sangre (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *E. faecium*) de características similares al T2 *Candida* con límites de detección de 1 ufc/ml y tiempo de respuesta de unas 3-5 h.

- iDTECT Dx Blood (Pathoquest) está basado en técnicas de secuenciación de genoma completo, permite detectar unas 800 especies bacterianas y 400 virus en muestras de sangre. Este método detecta ADN y ARN de bacterias y virus y compara los resultados obtenidos con bases de datos que proporciona el fabricante. Se requiere un secuenciador masivo. Por el momento, está en fase de evaluación.

- LiDia BSI test (DNAe) emplea 10 ml de sangre que se ponen en contacto con bolas inmunomagnéticas; tras la captura del ADN microbiano (bacterias y hongos), se realiza en un microchip una reacción de secuenciación basada en tecnología de semiconductores (*ion-sensitive field effect transistors*. ISFETs). Los resultados se obtienen en unas 3 h y el límite de detección es de 1 ufc/ml. También está en proceso de evaluación.

- VYOO (SIRS-Lab) es una técnica basada en PCR multiplex en formato convencional que detecta 34 especies bacterianas (grampositivos, gramnegativos y anaerobios), 7 especies de hongos y 5 mecanismos de resistencia (*mecA*, *vanA*, *vanB* y betalactamasas de espectro extendido del tipo SHV y CTX-M). La extracción de ADN se realiza de forma mecánica y mediante extracción selectiva con columnas que retienen del ADN microbiano en base a la metilación del ADN humano (*Looxter technology*). Después se realiza la amplificación de regiones selectivas de los distintos microorganismos que da lugar a productos de amplificación de diferentes tamaños que se separan por electroforesis en geles de agarosa y se identifican por tamaño. El tiempo de respuesta son unas 7h y la sensibilidad teórica está entre 5-100 ufc/ml. El método es bastante laborioso y requiere personal entrenado y laboratorios de biología molecular.

- IRIDICA BAC-BSI Assay (Abbott Molecular) utiliza PCR multiplex de espectro extendido asociada a un sistema de espectrometría de masas (*electrospray ionization mass spectrometry*) permitiendo identificar en menos de 7 horas, la presencia de 780 especies de microorganismos y cuatro determinantes de resistencia bacteriana (*bla_{KPC}*, *mecA*, *vanA*, *vanB*) con una elevada fiabilidad. Hay que resaltar que es capaz de detectar bacteriemias mixtas y la presencia de 18S ARNr indicativo de fungemia y que posee un alto poder predictivo negativo. Aunque los primeros trabajos mostraban resultados muy prometedores, la casa comercial ha decidido recientemente retirarlo del mercado.

En general los distintos artículos publicados demuestran que estos métodos, cuando son positivos, aportan información clínicamente relevante y reducen el tiempo de diagnóstico etiológico de bacteriemia/fungemia. Son complementarios del hemocultivo, ya que a pesar de su demora diagnóstica permiten recuperar a los microorganismos y realizar un antibiograma completo. Por otro lado, hay que tener en cuenta que hay pocos estudios en los que quede patente el impacto que estas pruebas pueden tener en la toma de decisiones clínicas. En este sentido, se han publicado pocos ensayos clínicos randomizados y en casi ningún estudio se valora el impacto clínico de los falsos positivos y negativos que tienen tanto el hemocultivo como las técnicas moleculares.

La introducción de este tipo de tecnología debe ser evaluada en cada laboratorio, ya que, aunque está claro que permite acelerar la identificación de microorganismos, también se incrementan los costes y sólo se han demostrado beneficios clínicos y económicos en un número limitado de trabajos, cuando los resultados se comunican de forma urgente y permanente a un equipo de control de tratamiento antibiótico con capacidad de modificar los tratamientos inadecuados o reducir el espectro antibiótico. Además, la baja sensibilidad de los métodos suele determinar un bajo valor predictivo negativo en la mayoría de los estudios que junto con la carencia de información sobre mecanismos de resistencia hace que, en muchos casos, su utilidad sea limitada a la hora del manejo clínico del paciente.

22. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS MICROORGANISMOS

Como ya se ha señalado, el tratamiento correcto y precoz es clave a la hora del manejo clínico de estos procesos, por lo que, en los últimos años, los Servicios de Microbiología están tratando de disminuir el tiempo de respuesta en relación a la sensibilidad antibiótica del patógeno implicado. Estos aspectos se han abordado desde diferentes puntos de vista, muchos de ellos recogidos en la tabla 2.

22.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS

Los estudios fenotípicos para la determinación de la sensibilidad antibiótica realizados directamente a partir del frasco de un hemocultivo positivo, tanto por el método de difusión con discos como por el de gradiente de difusión, no están avalados por las recomendaciones de EUCAST, CLSI ni ASM pero muchos estudios han comunicado que hay una excelente correlación entre los resultados obtenidos a partir del hemocultivo positivo y los que ofrece el método de referencia, que realiza el antibiograma a partir de la colonia bacteriana aislada en un medio sólido. La utilización de los nuevos sistemas automatizados de lectura continua en la mayoría de los Servicios de Microbiología podrían facilitar la estandarización del inóculo. Con el sistema directo se disminuye el tiempo de respuesta en 24 h aunque los resultados se deben considerar preliminares y siempre deben ser confirmados posteriormente con un método estandarizado.

Algunos laboratorios están dando un paso más e incluso están tratando de informar los resultados de sensibilidad a antimicrobianos en el mismo día en que el hemocultivo aparece como positivo. Estos procedimientos están aún menos validados pero en la práctica clínica habitual se utilizan métodos de difusión disco-placa, métodos de gradiente de difusión (Etest® y otros) y sistemas automáticos de lectura continua. De entre todos ellos, el sistema Vitek2 (BioMerieux) es el que más se ha estudiado y ofrece resultados rápidos para enterobacterias (entre 4 y 8 horas tras la inoculación) que tienen buena correlación con los obtenidos por los métodos estandarizados.

Es evidente que esta información precoz es fundamental para el correcto manejo del paciente pero es importante indicar siempre que los resultados emitidos son preliminares; cuando crezca la colonia en el medio sólido debe realizarse el estudio de sensibilidad aplicando las normas establecidas por los diferentes organismos internacionales con objeto de asegurar que la información emitida es correcta. Por otra parte, debe hacerse un proceso de evaluación y validación de estos métodos para que los Servicios de Microbiología puedan ofrecer resultados rápidos y con calidad adecuada. Tanto el EUCAST como el CLSI están trabajando en la estandarización de estos métodos.

Otro abordaje interesante para ofrecer información preliminar es la utilización de placas con medios cromogénicos para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a la vancomicina y enterobacterias productoras de BLEE o de carbapenemasas mediante el subcultivo de hemocultivos positivos. Estos medios tienen buena sensibilidad y especificidad, pero los resultados también tienen que ser siempre confirmados por los métodos de estudio de la sensibilidad estandarizados, por lo que en principio sólo deberían utilizarse si la situación epidemiológica así lo justifica.

22.2. MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

En relación con los métodos no basados en el cultivo que aportan información sobre la sensibilidad a antimicrobianos del microorganismo implicado en la bacteriemia a partir de hemocultivo positivo, están apareciendo nuevas tecnologías que deben ser validadas correctamente antes de que puedan ser aplicadas a la práctica clínica. En general aportan resultados poco tiempo después de la visualización de la tinción de Gram y, por tanto, sus datos son muy útiles clínicamente. Con objeto de modular las peticiones y disminuir el gasto sanitario es importante que se hagan dentro de un contexto de comunicación constante con el grupo hospitalario multidisciplinar responsable del manejo de estos procesos en cada centro.

Se han comercializado varios sistemas que además de detectar la presencia del genoma de diferentes patógenos tanto bacterianos como fúngicos también detectan la presencia de determinados

genes relacionados con la resistencia antibiótica a partir de los hemocultivos positivos. Han demostrado una gran sensibilidad y especificidad y los más validados por la literatura científica son:

- FilmArray Blood Culture Identification Panel (BioFire Diagnostics) realiza una PCR anidada en la que primero se amplifica una región de ADN que contiene el segmento diana; después este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR que tiene lugar en una matriz con pocillos que contienen los cebadores de los diferentes ensayos. Finalmente, mediante el fluorocromo LCGreen® Plus (*BioFire Diagnostics*) el instrumento evalúa la curva de fusión del ADN en cada pocillo de la matriz para determinar si aparece en dicho pocillo un producto de la PCR. Este sistema detecta, en una hora, 11 especies y 15 géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas y 5 especies de levaduras. Además detecta los genes de resistencia *mecA*, *vanA/B* y *blaKPC*.

- Sepsis Flow chip (Master Diagnostica) es un sistema que detecta la presencia de múltiples bacterias y mecanismos de resistencia en 3-4 horas. Detecta las principales especies de cocos grampositivos, *L. monocytogenes*, las principales especies de enterobacterias, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *Neisseria meningitidis* y algunas especies de levaduras. En cuanto a los mecanismos de resistencia, detecta la presencia de resistencia a meticilina en los estafilococos, la resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp., la producción de BLEE y de la gran mayoría de las carbapenemasas. Las primeras evaluaciones muestran que el sistema tiene una excelente sensibilidad y especificidad.

- GeneXpert (Cepheid) realiza la PCR en tiempo real para la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina (Xpert MRSA/SA® BC). Esta misma plataforma dispone también del sistema Xpert Carba-R que detecta, también en una hora, genes que codifican carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48 aunque no está optimizado todavía para su uso en hemocultivo positivo los resultados preliminares son muy prometedores.

- Verigene (Nanosphere) detecta la presencia de genoma bacteriano mediante hibridación con oligonucleótidos específicos sintéticos marcados con nanopartículas de oro. En bacterias grampo-

sitivas detecta en menos de 3 horas la presencia de 9 especies y 4 géneros bacterianos, así como los genes de resistencia *mecA* y *vanA/B*. Con el mismo tiempo de respuesta, en bacterias gramnegativas detecta la presencia de 5 especies y 4 géneros bacterianos y los genes de resistencia que codifican BLEE tipo CTX-M y carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA.

- BD GeneOhm StaphSR (BD Diagnostics) detecta la presencia de *S. aureus* y su resistencia a meticilina a través del casete genómico SCC*mec*. La técnica se realiza en 2,5 horas.

- BD MAX StaphSR Assay (BD Diagnostics) detecta la presencia de *S. aureus* y su resistencia a meticilina incluyendo el gen *mecC*. La técnica se realiza en 2 horas.

Hay otras plataformas que también son muy prometedoras pero sobre las que no hay tanta información disponible, de ellas, podemos destacar:

- Eazyplex (Amplex Biosystems GmbH) consiste en una plataforma que realiza la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Esta técnica se fundamenta en la amplificación de ADN por desplazamiento de cadena a una temperatura constante. De este modo, el sistema no precisa de termociclador. El eazyplex SuperBug CRE detecta en 30 minutos la presencia de genes que codifican BLEE tipo CTX-M y carbapenemasas tipo VIM, NDM, KPC y OXA-48; también la presencia de *S. aureus*.

- AID (Autoimmun Diagnostika GmbH) es una PCR basada en ensayos de sondas en línea. En este caso, una vez que se ha realizado la PCR tiene lugar la hibridación inversa de los amplicones con sondas complementarias ancladas a una tira de nitrocelulosa. La hibridación es detectada utilizando un marcador de biotina presente en los cebadores utilizados en la PCR, obteniéndose un patrón de bandas que se interpreta de forma visual o con un escáner. Entre los kits de resistencia a antibióticos destaca el AID ESBL que detecta genes que codifican BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M y carbapenemasas tipo KPC en 5 horas. Está en proceso de validación para hemocultivos.

- LightMix, utilizando la plataforma LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics), detec-

ta carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48 en una hora y media.

- Check-Direct CPE puede utilizarse en varias plataformas de PCR en tiempo real, como la ABI 7500 (Applied), CFX96TM (Bio-Rad), LightCycler 480 system I & II (Roche), Rotor-Gene Q (Qiagen) y BD MAXTM (Becton Dickinson). Este kit incorpora los reactivos necesarios para la detección, en 2 h, de genes que codifican carbapenemasas tipo KPC, NDM, VIM y OXA-48. Está en proceso de validación en hemocultivos.

- MyCycler (Bio-Rad) se basa en una PCR mediada por ligación: se utilizan 2 sondas de ADN que reconocen al gen que interesa detectar y si está presente, una ADN ligasa realiza la unión, generando un ADN de doble cadena. Por último, la PCR en tiempo real tiene lugar en la plataforma ABI 7500 (Applied) utilizando unos *primers* universales. Se han desarrollado sistemas para detección de BLEE tipo CTX-M, TEM y SHV y otro para carbapenemasas tipo KPC, NDM, IMP, VIM, y OXA-48. Ambos sistemas proporcionan resultados en 4 horas y media y están en proceso de validación en hemocultivos.

- GenoType Blood culture (Hain Lifescience): Tras un proceso de extracción del DNA y amplificación, se detecta mediante hibridación con sondas específicas en tiras de nitrocelulosa la presencia de 17 bacterias Gram positivas (incluyendo genes de resistencia a meticilina y a vancomicina) y 15 bacterias Gram negativas. El proceso tarda 5 horas.

- MagicPlex Sepsis Test (Seegene) es un sistema de PCR multiplex con detección con oligonucleótidos-sonda marcados con fluorescencia (*dual priming oligonucleotide*). En este método se realiza una primera PCR en formato convencional para obtener un banco de amplicones fluorescentes, que se analizan en una segunda etapa en un termociclador de PCR a tiempo real. En esta técnica se llevan a cabo varias reacciones de PCR para detectar 73 especies de bacterias grampositivas, 12 de gramnegativas, 6 especies de hongos y 3 regiones asociadas a resistencia (*mecA*, *vanA* y *vanB*). La extracción del ADN de la muestra está automatizada y los resultados se obtienen teóricamente en 6 horas. Es un método laborioso que requiere experiencia y laboratorios de biología molecular.

- Check points Health BV ha comercializado tres sistemas (Check-MDR CT102, Check-MD CT103 y Check-MDR CT103 XL) que permiten detectar un gran número de genes que codifican diferentes beta-lactamasas (BLEE, AmpC y carbapenemasas). Estos microarrays tardan 8 horas en ofrecer resultados, presentan una sensibilidad y una especificidad muy elevada pero aún no están suficientemente validados para ser aplicados directamente de frascos de hemocultivos positivos.

- Prove-it sepsis (MobiDiag) es un test de detección de 60 especies bacterianas incluyendo detección de resistencia a meticilina y a vancomicina y 13 especies de hongos mediante PCR multiplex de los genes codifican para distintas topoisomerasas e hibridación con sondas específicas en un microarray en tubo. La identificación se puede realizar en unas 3 horas. Se detecta además el gen *mecA*. Los datos de sensibilidad y especificidad publicados varían entre 95-99% y 99-100%.

22.3. OTRAS TÉCNICAS RÁPIDAS

Existen diferentes opciones en el mercado entre las que destacan:

- β LACTA test (Bio-Rad) es un sistema rápido de detección de enterobacterias productoras de BLEE basada en un sistema colorimétrico y también ha mostrado buenos resultados cuando se ha aplicado a frascos positivos de hemocultivos.

22.4.- MÉTODOS DE IMAGEN

En la actualidad existe un único sistema, ACCELERATE pheno SYSTEM (*Accelerate Diagnostics*) que combina una técnica de electrofiltración en gel e hibridación in situ fluorescente (FISH) junto a la microscopía automatizada que permite identificar en 90 minutos la presencia de 10 especies y 6 géneros bacterianos. Mediante la monitorización del crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico puede ofrecer resultados sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo en aproximadamente 7 horas.

22.5. NEFELOMETRÍA

El sistema Alfred AST (Alifax) monitoriza de forma automática el crecimiento bacteriano mediante nefelometría, midiendo la dispersión de la luz en tubos

que contienen medio líquido de enriquecimiento y antibiótico junto con una alícuota del hemocultivo positivo; realiza una cuantificación de bacterias vivas eliminando las interferencias de eritrocitos, leucocitos o células muertas. Este sistema ofrece una gran variedad de antimicrobianos y permite conocer la sensibilidad (S/I/R) en aproximadamente 5 horas con una correlación con los datos obtenidos con un método de microdilución en caldo de más del 95%.

22.6. FUTURO

Actualmente se está abordando la problemática de la determinación rápida de la sensibilidad a antimicrobianos directamente de hemocultivos utilizando diferentes metodologías pero todavía no están suficientemente validadas para su aplicación clínica. Así, mediante citometría de flujo y la utilización de diferentes fluorocromos se puede conocer la población bacteriana en una muestra con y sin antibiótico y por tanto conocer la actividad de éste. La detección de bioluminiscencia para detectar bacterias viables en presencia y ausencia de antibiótico es otro abordaje prometedor.

23. CONTROL DE CALIDAD

El Servicio de Microbiología debe disponer de un manual de procedimientos debidamente actualizado en el que se describa exhaustivamente la metodología para la realización de los hemocultivos cumpliéndose, en la medida de lo posible, los requisitos para poder estar certificado o acreditado por organismos con capacidad para ello. La norma UNE-EN-ISO 15189: 2013: "Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia", especifica los requisitos relativos a la calidad y la competencia que afectan a los laboratorios clínicos, quienes deben emplear esta norma internacional para desarrollar sus propios sistemas de gestión de la calidad, para ser reconocidos junto a su competencia técnica por una entidad evaluadora que así lo acredite (ENAC, Entidad Nacional de Acreditación).

La elaboración de protocolos normalizados de trabajo en los que se detalle cómo debe realizarse el registro informático de las peticiones, cuáles son las condiciones idóneas de extracción, envío, transporte y conservación de las muestras, número e intervalo de extracción de los hemocultivos, el vo-

lumen de sangre para cultivar, la selección del tipo de frasco o medio de cultivo, etc. y su distribución entre los usuarios, así como la realización de reuniones informativas son aspectos fundamentales en el aseguramiento del sistema de calidad que se quiera implantar.

Como parte del aseguramiento de la calidad de los ensayos realizados, es necesario realizar controles internos (que pueden corresponderse con cada nuevo lote de reactivos) o bien realizarse con una periodicidad establecida por el propio responsable del área. En muchas ocasiones es posible seguir estrictamente las indicaciones del fabricante. En el documento técnico de este procedimiento (PNT-HMM-1) se hace una propuesta para la realización del control de calidad.

Periódicamente, y al menos una vez al año, deberán evaluarse los resultados obtenidos del procesamiento de los hemocultivos. Se evaluará la tasa de positividad, la de falsos positivos y las cifras totales de los diferentes microorganismos aislados. Si los hemocultivos se obtienen y procesan correctamente, la tasa de contaminación no debe superar el 3% del total de los hemocultivos. Si es superior deberán establecerse medidas para mejorar este procedimiento y ante un aumento de falsos positivos o pseudobacteriemias se deben revisar exhaustivamente todos los procedimientos desde la extracción hasta el procesamiento final del hemocultivo. La tasa de falsos negativos no debe ser superior al 0,5%. Una forma de comprobar este último aspecto es realizar periódicamente un subcultivo de salida a todos los frascos que hayan cumplido el período de incubación. También se pueden inocular en frascos de hemocultivos un panel de bacterias representativas de los microorganismos que habitualmente se aíslan, incluyendo bacterias de difícil crecimiento como *Haemophilus influenzae*.

Una tasa de positividad muy baja puede reflejar una excesiva utilización de los hemocultivos por lo que debe monitorizarse el número de bacteriemias, así como su origen, comunitario o intrahospitalario, y su localización por servicios. Estos datos proporcionan información esencial para el conocimiento, vigilancia y control de la infección.

Todo laboratorio debe trabajar para optimizar sus indicaciones en la obtención de hemocultivos para mejorar la eficacia (aumentar el número de hemocultivos positivos), efectividad (disminuir los conta-

minados) y la eficiencia (no solo por el coste de su obtención y procesamiento, también en relación con la probable mejora de la administración precoz y adecuada del antibiótico).

Algunos países, como Dinamarca, han puesto en marcha sistemas de registro de las bacteriemias a nivel nacional, lo que aporta mucha información útil en el mejor abordaje del diagnóstico y del tratamiento de este proceso y sería una medida que debería extenderse a otros ámbitos nacionales y/o europeos. Por otra parte, se ha puesto en marcha un programa de prevención de bacteriemia asociada a catéter (Bacteriemia ZERO) a nivel nacional que ha demostrado buenos resultados por lo que este tipo de campañas se deberían extender a otros ámbitos: hemocultivos contaminados, etc.

24. CONCLUSIONES

El diagnóstico rápido y correcto de las bacteriemias/fungemias debe ser una de las prioridades estratégicas de todos los Servicios de Microbiología y debe estar incluido en un sistema multidisciplinar de manejo de estas patologías, que debe estar instaurado en cada hospital de tal manera que todos los pacientes puedan beneficiarse de forma precoz de los resultados. Por otra parte, el diagnóstico rápido y correcto de estos procesos contribuirá a mejorar el uso de los antibióticos con lo que, además de una disminución del gasto sanitario, se ayuda a controlar la resistencia a antimicrobianos.

Deben ponerse en marcha las medidas necesarias para que se disponga de la mayor cantidad de información posible en menos de 6 horas tras la positividad del hemocultivo ya que toda información emitida en ese periodo es muy útil para el manejo del paciente. Esta información debe ser transmitida de forma urgente y preferiblemente automatizada a los grupos multidisciplinarios encargados del manejo de esta patología; de hecho cuando se han aplicado sistemas rápidos y eficientes de comunicación se ha demostrado que tienen incidencia sobre la evolución clínica de los pacientes. En este sentido, es muy importante que se avance a la atención continuada durante las 24 horas todos los días de la semana ya que actualmente el Servicio de Microbiología dispone de muchos métodos rápidos cuya aplicación justificaría esta ampliación de horario, a pesar del coste económico que esto pueda suponer.

25. BIBLIOGRAFIA

1. Altun O, Almuhayawi M, Lüthje P, Taha R, Ullberg M, Özenci V. Controlled evaluation of the new BacT/Alert Virtuo blood culture system for detection and time to detection of bacteria and yeasts. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1148-1151.
2. Banerjee R, Özenci V, Patel R Individualized approaches are needed for optimized blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2016;63:1332-1339.
3. Bouza C, López-Cuadrado T, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JM. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011). *BMC Infect Dis.* 2014;14:3863.
4. Buehler SS, Madison B, Snyder SR, Derzon JH, Cornish NE, Saubolle MA, Weissfeld AS, Weinstein MP, Liebow EB, Wolk DM. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:59-103.
5. Eliakim-Raz N, Bates DW, Leibovici L. Predicting bacteraemia in validated models--a systematic re-view. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:295-301.
6. Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, Haugaard C, Heuschneider S, Kranz BP, McLean K, Morales KL, Owens S, Paciella ME, Torregrosa E. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control.* 2015;43:1222-1237.
7. Gubbels S, Nielsen J, Voldstedlund M, Kristensen B, Schønheyder HC, Vandenbroucke-Grauls CM, Arpi M, Björnsdóttir MK, Knudsen JD, Desau RB, Jensen TG, Kjældgaard P, Lemming L, Møller JK, Hansen DS, Mølbak K. Utilization of blood cultures in Danish hospitals: a population-based descriptive analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:344.e13-21.
8. Guembe M, Rodríguez-Créixems M, Sánchez-Carrillo C, Pérez-Parra A, Martín-Rabadán P, Bouza E. How many lumens should be cultured in the conservative diagnosis of catheter-related bloodstream infections? *Clin Infect Dis.* 2010;50:1575-1579.
9. Hoeboer SH, van der Geest PJ, Nieboer D, Groeneveld AB. The diagnostic accuracy of

- procalcitonin for bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:474-481.
10. Jacobs MR, Mazzulli T, Hazen KC, Good CE, Abdelhamed AM, Lo P, Shum B, Roman KP, Robinson DC. Multicenter Clinical Evaluation of BacT/Alert Virtuo blood culture system. *J Clin Microbiol.* 2017; doi: 10.1128/JCM.00307-17.
 11. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ y González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32:177-190.
 12. Karakullukçu A, Kuşkucu MA, Ergin S, Aygün G, Midilli K, Küçükbasmaci Ö. Determination of clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87:291-294.
 13. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:513-520.
 14. Kirn TJ, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Controlled clinical comparison of BacT/alert FA plus and FN plus blood culture media with BacT/alert FA and FN blood culture media. *J Clin Microbiol.* 2014;52:839-843.
 15. Kleinschmidt S, Huygens F, Faoagali J, Rathnayake IU, Hafner LM. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiol.* 2015;10:1859-1879.
 16. Laupland KB, Church DL. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:647-664.
 17. Nair A, Elliott SP, Al Mohajer M. Knowledge, attitude, and practice of blood culture contamination: A multicenter study. *Am J Infect Control.* 2017;45:547-548.
 18. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:313-322.
 19. Pavlinac PB, Lokken EM, Walson JL, Richardson BA, Crump JA, John-Stewart GC. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2016;20:895-902.
 20. Planes AM, Calleja R, Bernet A, Campins-Martí M, Almirante B, Pumarola T, et al. Evaluation of the usefulness of a quantitative blood culture in the diagnosis of catheter-related bloodstream infection: Comparative analysis of two periods (2002 and 2012). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34: 484-489.
 21. Ramirez P, Gordón M, Cortes C, Villarreal E, Perez-Belles C, Robles C, de Hevia L, Martí JV, Botella J, Bonastre J. Blood culture contamination rate in an intensive care setting: effectiveness of an education-based intervention. *Am J Infect Control.* 2015;43:844-847.
 22. Rodríguez JC, Bratos AM, Merino E, Ezpeleta C. Use of MALDI-TOF in the rapid diagnosis of sepsis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 (Suppl 2):19-25.
 23. Self WH, Mickanin J, Grijalva CG, Grant FH, Henderson MC, Corley G, Blaschke DG, McNaughton CD, Barrett TW, Talbot TR, Paul BR. Reducing blood culture contamination in community hospital emergency departments: a multicenter evaluation of a quality improvement intervention. *Acad Emerg Med.* 2014;21:274-282.
 24. Tziolos N, Giamarellos-Bourboulis EJ. Contemporary approaches to the rapid molecular diagnosis of sepsis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16:1201-1207.
 25. Yébenes JC, Ruiz-Rodríguez JC, Ferrer R, Clèries M, Bosch A, Lorenzo C, Rodríguez A, Nuvials X, Martín-Loeches I, Artigas A; SOCMIC (Catalonian Critical Care Society) Sepsis Working Group. Epidemiology of sepsis in Catalonia: analysis of incidence and outcomes in a European setting. *Ann Intensive Care.* 2017;7:19. doi: 10.1186/s13613-017-0241-1.

Tabla 2. Sistemas comerciales disponibles para la detección de bacteriemia y fungemia

Nombre comercial	Bacterias	Hongos	Sensibilidad a antimicrobianos	Muestra	Tiempo
Light Cycler Septifast® Test MGRADE	25 especies	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>A. fumigatus</i>	<i>mecA</i> en prueba adicional	Sangre	6 horas
SepsiTest	Muchas	Muchas	No	Sangre	8-12 horas
T2MR	En desarrollo	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i>	No	Sangre	3-5 horas
iDTECT Dx Blood	800 especies y 400 virus	No	No	Sangre	2-3 Días
LDI BSI tes	Muchas	Muchas	No	Sangre	3 horas
MagicPlex Sepsis	Gram +: 73 especies Gram -: 12 especies	6 especies	<i>mecA</i> <i>vanA</i> y <i>vanB</i>	Sangre	6 horas
VYOO	34 especies	7 especies	<i>mecA</i> <i>vanA</i> , <i>vanB</i> <i>blaSHV</i> y <i>blaCTX-MBLEE</i> (SHV, CTX-M)	Sangre	7 horas
IRIDICA	780 especies	Muchas especies	<i>mecA</i> <i>vanA</i> , <i>vanB</i> Carbapenemasa KPC	Sangre	7 horas
AccuProbe	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. grupos A y B	No	No	Frasco +*	30 Minutos
GenomEra™ <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	No	No	Frasco +	Minutos
GenomEra™ <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	No	Resistencia a meticilina	Frasco +	Minutos
PNA-FISH	<i>S. aureus</i> Estafilococos coagulasa (-) <i>E. faecalis</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i>	No	Frasco +	Minutos
MALDI-TOF	Miles	Levaduras Hongos filamentosos	Todavía en validación	Frasco +	Minutos
BinaxNOW <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	No	No	Frasco +	Minutos
FilmArray	11 especies y 15 géneros de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	5 especies de levaduras	<i>mecA</i> , <i>vanA/B</i> y <i>blaKPC</i>	Frasco +	1 hora
GenoType Blood culture (Hain Lifescience):	17 bacterias Gram positivas y 15 especies de Gram negativas	No	Meticilina y vancomicina	Frasco +	5 h horas
GeneXpert	<i>S. aureus</i>	No	<i>mecA</i> Carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48)	Frasco +	1 hora

Tabla 2. Continuación

Nombre comercial	Bacterias	Hongos	Sensibilidad a antimicrobianos	Muestra	Tiempo
Verigene	Gram +: 9 especies y 4 géneros Gram -: 5 especies y 4 géneros	No	<i>mecA</i> y <i>vanA/B</i> BLEE tipo CTX-M Carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP y OXA)	Frasco +	3 horas
BD GeneOhm StaphSR	<i>S. aureus</i>	No	Resistencia metilina	Frasco +	2,5 horas
BD MAX StaphSR Assay (BD Diagnostics)	<i>S. aureus</i>	No	Resistencia metilina	Frasco +	2 horas
Eazyplex	No	No	BLEE CTX-M Carbapenemasas (VIM, NDM, KPC y OXA-48) <i>S. aureus</i>	Frasco +	30 minutos
AID	No	No	BLEE (TEM, SHV y CTX-M) Carbapenemasas KPC	Frasco +	5 horas
LightMix	No	No	Carbapenemasas (KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48)	Frasco +	2 horas
Check- Direct CPE	No	No	Carbapenemasas (KPC, NDM, VIM y OXA-48)	Frasco +	2 horas
MyCycler	No	No	BLEE (CTX-M, TEM y SHV) Carbapenemasas (KPC, NDM, IMP, VIM, y OXA-48)	Frasco +	4,5 horas
ImmuLex <i>S.pneumoniae</i> Omni	<i>S. pneumoniae</i>	No	No	Frasco +	Minutos
Sepsis Flow chip	<i>Listeria</i> Estafilococos Estreptococos <i>Enterococcus</i> spp Enterobacterias <i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i> <i>S. maltophilia</i> , <i>N. meningitidis</i>	Algunas especies de levaduras	<i>mecA</i> <i>vanA</i> , <i>vanB</i> BLEE Carbapenemasas (la mayoría de las descritas)	Frasco +	3-4 horas
Check points	No	No	BLEE AmpC Cabapenemasas	Frasco +	8 horas
Prove-it sepsis	60 especies	13 especies	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> y <i>vanB</i>	Frasco +	3 horas
β LACTA test	No	No	BLEE	Frasco +	Minutos
ACCELERATE	10 especies y 6 géneros bacterianos	No	Múltiples antibióticos	Frasco +	Identificación: 90 minutos Antibiograma: 7 horas
Alfred AST	No	No	Múltiples antibióticos	Frasco +	5 horas

*Frasco +: frasco de hemocultivo con crecimiento bacteriano

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 14

PNT-HMM-01

Procesamiento de hemocultivos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 14

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento y la realización de los hemocultivos. Este documento es de aplicación a todas las muestras de hemocultivos remitidas a los servicios de Microbiología, desde el momento de su extracción (cuyo proceso debe realizarse de acuerdo con unas normas establecidas por el responsable del área de hemocultivos en el servicio de Microbiología y consensuadas con el resto de los servicios hospitalarios) hasta la emisión de los resultados

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de la bacteriemia es una de las prioridades de los laboratorios de Microbiología Clínica. Aunque generalmente los principales microorganismos productores de bacteriemia pueden crecer en pocas horas, cuando se utilizan sistemas automatizados de monitorización continua, se establecen protocolos de incubación de cinco días. Ante la sospecha clínica de microorganismos de crecimiento lento, como los pertenecientes al grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp. *Eikenella* spp. y *Kingella* spp.), *Brucella* spp, micobacterias y hongos, se requieren períodos de incubación más largos e incluso pueden requerir medios de cultivo especiales o métodos no basados en el cultivo.

Hay una serie de puntos clave que influyen en el rendimiento microbiológico de los hemocultivos para el diagnóstico de laboratorio de bacteriemia / fungemia:

- 1.- El volumen de sangre debe estar entre 5-10 ml por frasco
- 2.- La extracción de la sangre para el cultivo debe realizarse antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.
- 3.- Hay que evitar las contaminaciones de los frascos, para ello es necesario:
 - a) Desinfectar el sitio de venopunción
 - b) Utilizar guantes, mascarilla y no tocar con la mano en el lugar de la venopunción
 - c) No extraer los hemocultivos a través de catéter
- 4.- Introducir los frascos lo más rápidamente posible en el incubador; si esto no fuera posible, mantenerlos a temperatura ambiente (no refrigerar ni incubar en estufa).
- 5.- Se recomienda realizar 2-3 extracciones en adultos (cada una con un frasco aerobio y un frasco anaerobio). En niños es suficiente con una extracción de un solo frasco.

En los últimos años, los métodos clásicos, basados en el cultivo se están complementando con sistemas de microbiología molecular que permiten ofrecer al clínico una información más rápida sobre la etiología del proceso y la sensibilidad antibiótica del microorganismo implicado

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis.* 2013;57:e22-e121.

2. Baron EJ, Weinstein MP, Dunne WM, Yagupsky P, Welch DF, Wilson DM. *Cumitech 1C, Blood cultures IV.* Coordinating editor, Baron EJ, editor. ASM Press, Washington, DC. 2005

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 14

4. MUESTRAS

4.1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA SANGRE

4.1.1. Preparación del material

La extracción de los hemocultivos sólo debe realizarse por personal previamente formado ya que el procedimiento difiere mucho de una extracción normal de sangre; además, debe disponer de un paquete con todo el material necesario y listo para su uso: frascos de hemocultivos, guantes y mascarilla, solución desinfectante y jeringa capaz de extraer la cantidad de sangre necesaria para inocular ambos frascos

4.1.2. Extracción de la muestra

El procedimiento a seguir se indica a continuación:

- 1.- Utilizar mascarilla y guantes, preferiblemente estériles
- 2.- Levantar la lengüeta plástica de los frascos y limpiar los tapones con una gasa impregnada en clorhexidina.
- 3.- Colocar el compresor al paciente tras elegir la vena a pinchar y limpiar con una gasa impregnada en clorhexidina una zona de la piel de un diámetro de 10 cm en el lugar elegido para la punción. Dejar actuar al menos 1 minuto.
- 4.- Extraer de 5-10 ml por frasco en los adultos y el mayor volumen posible en los niños (1-3 ml por frasco).
- 5.- Introducir la sangre, pinchando a través del tapón de goma, en cada uno de los dos frascos correspondientes a esa extracción (primero frasco anaerobio y luego frasco aerobio), evitando la entrada de aire en ambos frascos. Nunca se destapará el tapón de goma que viene sellado con una arandela metálica. Se tendrá la precaución de sujetar bien el émbolo de la jeringa para que la presión del vacío que existe en el frasco no aspire un exceso de sangre ni el aire que pudiera quedar en el fondo de la jeringuilla. Es correcta la utilización del sistema Vacutainer para la extracción de los hemocultivos, teniendo la precaución de extraer los frascos de hemocultivos antes de otros tubos para evitar contaminaciones.
- 6.- Cada frasco se identificará con una etiqueta adhesiva en la que deben figurar los datos del paciente (nombre, historia clínica), el número de extracción realizada (1ª, 2ª ó 3ª), el lugar de la extracción (sangre periférica o a través de catéter) y el servicio de procedencia (incluyendo la cama). Hay que tener la precaución de no tapar la etiqueta de código de barras del frasco al pegar la etiqueta de identificación del paciente.

4.1.3. Transporte de la muestra al laboratorio

Una vez extraídos los hemocultivos, deben ser remitidos lo antes posible al servicio de Microbiología. Nunca deben dejarse en nevera ni tampoco en estufa. En el caso de que no puedan ser remitidos tras la extracción, se mantendrán a temperatura ambiente hasta el momento de su envío, que deberá realizarse con las medidas de bioseguridad adecuadas siendo imprescindibles los contenedores de seguridad biológica (frascos especialmente diseñados para este fin) si son remitidos por sistemas de aspiración como el tubo neumático. Debe tenerse muy en cuenta que retrasos prolongados en el transporte de estas muestras pueden influir negativamente en el resultado del estudio, por prolongación del tiempo de respuesta o incluso por la posibilidad de falsos negativos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 14

4.1.4. Recepción e identificación de la muestra

Cuando los frascos de hemocultivos llegan al laboratorio, lo primero es verificar que están correctamente identificados; entonces, se registra el volante de petición en el sistema informático (si este llega en papel) o simplemente se activa si se trata de una petición electrónica. El procedimiento debe asegurar que las muestras estén siempre correctamente identificadas con el fin de asegurar la trazabilidad de las mismas.

4.1.5. Criterios de rechazo

El laboratorio de Microbiología debe establecer con los hemocultivos, al igual que hace de forma general con el resto de muestras que recibe, una serie de criterios para el rechazo de muestras no adecuadas para cultivo. A su llegada al laboratorio, se debe determinar si el hemocultivo cumple con los requisitos básicos para poder ser procesado (correcta identificación, condiciones adecuadas de transporte y conservación, etc...).

Las incidencias más frecuentes que pueden ser causa de rechazo del hemocultivo son:

- Hemocultivos mal identificados: no se debe aceptar ninguna muestra sin identificar, o en la que no coincidan la identificación del volante de petición con la de la muestra. En cualquier caso, se contactará con el servicio peticionario haciéndole conocer la necesidad de que procedan a la correcta identificación de la muestra.
- Hemocultivo con frasco roto: esta muestra no puede ser aceptada, dada la imposibilidad de su procesamiento. Si llega en estas condiciones al laboratorio, se debe solicitar una nueva muestra y contactar con el servicio o médico peticionario para que sea conocedor de las condiciones en las que la muestra llega al servicio de Microbiología.
- Transporte/conservación inadecuados: si no se cumplen los requisitos básicos de conservación y transporte de los hemocultivos se debe valorar la posibilidad de solicitar nueva muestra. Es el caso de aquellos hemocultivos que han sido refrigerados durante su transporte o incubados en estufa de 36°C (+/-1°C) previamente a su introducción en los sistemas automatizados de Microbiología, se puede optar por procesar estas muestras, y cuando se informen los resultados indicar por escrito al servicio solicitante la incidencia en la recogida/transporte de dicho/s hemocultivos (condiciones en que llega al laboratorio) indicando que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la debida precaución, trasladando el clínico la decisión de usar o no los datos.

Como conclusión, se puede decir que, en general, no se rechazará nunca un hemocultivo dada la importancia del diagnóstico de la bacteriemia, salvo en el caso en que haya duda en cuanto a la identificación de la muestra o los frascos estén dañados.

4.1.6. Sistemas automatizados de procesamiento

Una vez que los hemocultivos han sido registrados en el sistema informático del laboratorio y etiquetados con su número de petición correspondiente, es muy importante la introducción inmediata de los mismos en el incubador, ya que el retraso en la incubación puede dificultar la recuperación de algunos microorganismos siendo causa, incluso, de falsos negativos. Además, estos aparatos permiten el registro de la entrada del frasco, la curva de crecimiento, el tiempo de positividad, el momento de descarga e incluso la cantidad de sangre que contienen; habitualmente, los incubadores están conectados al sistema informático lo que facilita la transmisión bidireccional automática de datos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 14

Los sistemas de incubación automatizados para el procesamiento de los hemocultivos que existen hoy en el mercado han supuesto un avance sustancial, ya que los frascos de hemocultivos se introducen en aparatos que mantienen la temperatura a unos 36 (+/-1°C) con celdas individuales en agitación continua para facilitar la multiplicación bacteriana y realizan una monitorización continua para la detección de frascos positivos. Cada casa comercial desarrolla diferentes frascos con especificaciones concretas; en general, existen frascos diseñados para aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias facultativas y frascos para aislamiento de anaerobios facultativos y estrictos. También existen frascos optimizados para pediatría y los selectivos para micobacterias (medio Middlebrook 7H9) u hongos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Frascos de hemocultivos (almacenar a temperatura ambiente): frasco aerobio, frasco anaerobio y frasco pediátrico.
- Frascos selectivos para micobacterias y para hongos (en su caso)
Cada sala del hospital debe solicitar los frascos al almacén general. El tipo de frascos que deben utilizarse y la empresa que los suministra será decisión del servicio de Microbiología.
- Medios de cultivo para subcultivo e identificación (nevera 4°C):
 - Agar chocolate
 - Agar sangre
 - Agar Brucella suplementado con hemina y vitamina K, u otros medios para el cultivo de anaerobios
 - Agar Mueller-Hinton
 - Agar MacConkey
 - Agar Columbia CNA
 - Agar bilis esculina
 - Agar Sabouraud cloranfenicol
 - CHROMagar Candida
 - Otros medios

5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Reactivos para tinción de Gram (temperatura ambiente):
- Discos de antibióticos, tiras de gradiente de antibióticos o paneles de microdilución para determinación de la sensibilidad antibiótica y la identificación (temperatura ambiente, nevera 4°C o congelador (-20°C), según las recomendaciones del fabricante)
- Pruebas de detección de antígenos (seguir las instrucciones del fabricante)
- Tiras para la determinación de oxidasa (nevera a 4°C)
- Reactivos de espectrometría de masas
- Reactivos para la detección de diferentes patógenos y sus resistencias por métodos moleculares

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 14

6. APARATOS Y MATERIAL

6.1. APARATOS

- Sistema de incubación y detección automática de hemocultivos positivos
- Neveras (para reactivos y placas de cultivo)
- Estufa de cultivo a 36°C (+/-1°C)
- Cabina de seguridad biológica de clase II A
- Microscopio óptico
- Equipo para tinciones automatizadas
- Sistema de espectrometría de masas (MALDI-TOF)
- Sistema de PCR a tiempo real
- Sistema de incubación de placas en anaerobiosis

6.2. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

- Asas desechables
- Agujas y jeringas para subcultivos (dispositivos actuales que los sustituyen y evitan accidentes)
- Torundas (para antibiogramas preliminares)
- Portaobjetos
- Guantes
- Papel de filtro

7. PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS

7.1. INTRODUCCIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS EN EL SISTEMA (específica del sistema utilizado por el laboratorio)

7.2. EXTRACCIÓN DE LOS FRASCOS CON SOSPECHA DE CRECIMIENTO (específica del sistema utilizado por el laboratorio)

7.3. PROCESAMIENTO DE LOS FRASCOS POSITIVOS

Los frascos que el sistema ha detectado como positivos serán manipulados en la cabina de seguridad biológica. Se introduce en cada uno de los tapones de goma de los frascos una aguja con su jeringa (o un dispositivo especialmente diseñado para extraer sangre de los frascos que han sido detectados como positivos). Se invierten los frascos con una ligera agitación y se extraen de los mismos aproximadamente 2 ml de caldo que se emplean para la realización primero de los subcultivos en medios sólidos y después para la tinción de Gram. Después de la observación de la tinción de Gram se llevan a cabo las pruebas adicionales para identificar el/los microorganismos visualizados y sus mecanismos de resistencia, así como el antibiograma preliminar.

Una vez terminado el procesamiento de los frascos, éstos se guardan en estufa de 36°C (+/-1°C) hasta la finalización de la identificación y estudio de sensibilidad del (de los) microorganismo(s) aislado(s) o en el tiempo

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 14

que tenga establecido cada laboratorio según su protocolo.

7.3.1. Subcultivo inicial

A todos los frascos positivos se les realizará un subcultivo en placas de agar que se seleccionarán en función del resultado de la tinción de Gram, el tipo de frasco (aerobio o anaerobio) y las características del paciente (sospecha de micosis, etc.). Tras la siembra de las mismas, se incubarán en estufa durante 24 horas y se procederá a su lectura e interpretación.

Si tras 24 h de incubación las placas son negativas se incubarán otras 24 h y se revisará la tinción de Gram con objeto de detectar la presencia de microorganismos no sospechados y que necesiten requerimientos especiales de aislamiento (medios, anaerobiosis o microaerofilia, etc.)

7.3.2. Tinción de Gram

- Colocar en el interior de la cabina dos portaobjetos por frasco positivo rotulados con el número de registro de cada frasco seguido de una letra, por ejemplo, si se trata de un frasco aerobio una "A" y "ANA" o "B" si es un frasco anaerobio.
- Colocar, sobre los correspondientes portaobjetos, una gota del caldo y extender ligeramente con un asa desechable. Hay que comprobar siempre la coincidencia del número del frasco y del número rotulado en los portaobjetos, sobre todo cuando se procesan varios hemocultivos a la vez.
- Dejar secar las extensiones y fijar con metanol o con calor.
- Realizar la tinción de Gram con una de las dos extensiones de cada frasco positivo (reservar la segunda extensión por si es necesaria una segunda tinción).

El facultativo realizará la visualización microscópica de la tinción, cuyo resultado (morfología del microorganismo) se anotará en la hoja de trabajo indicándose los subcultivos y pruebas adicionales que deben realizarse, así como el antibiograma preliminar si procede.

Rápidamente, se informará el resultado de la tinción de Gram en el sistema informático del laboratorio para que pueda ser visualizado por el médico peticionario; cuando el microorganismo por sus características microscópicas pueda tener relevancia clínica, el facultativo debe informar telefónicamente (o por cualquier otra vía establecida con el grupo multidisciplinar de manejo de procesos infecciosos) de su hallazgo al clínico al responsable del paciente.

7.3.3. Pruebas de microbiología molecular

Actualmente estas pruebas se dividen en dos grupos: las que estudian el proteoma del organismo que se utilizan en la identificación de la etiología del proceso, y las que estudian el genoma de mismo, utilizadas tanto en la identificación como en la detección de genes de resistencia.

Debido al elevado coste de las mismas, deben realizarse cuando sean útiles clínicamente y deben comunicarse rápidamente al médico responsable del paciente para que sus resultados tengan una aplicación real en el manejo del mismo.

Debido al elevado número de casas comerciales que distribuyen este tipo de pruebas no se pueden indicar procedimientos de trabajo concretos, pero hay que tener en cuenta que deben seleccionarse las que hayan

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 14

sido validadas para el trabajo a partir de hemocultivos positivos y siempre se debe seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante en relación con el protocolo de trabajo.

Las pruebas de microbiología molecular que se realizan a partir de la sangre del paciente están mucho menos validadas clínicamente y siempre deben ser realizadas de forma paralela al cultivo tradicional; también deben realizarse cumpliendo estrictamente las normas del fabricante.

7.3.4. Subcultivos y métodos de identificación según morfología observada en la tinción de Gram

a) Cocos grampositivos en racimos (tipo estafilococo): se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre. Si la situación epidemiológica lo requiere, pueden incluirse placas selectivas para detectar *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Se realizarán las siguientes pruebas:

- Sistema de PCR a tiempo real o de detección de antígenos proteicos para detección de la presencia de *Staphylococcus aureus* y de la resistencia a meticilina.
- Espectrometría de masas (MALDI-TOF): puede identificarse el microorganismo implicado por este método, obteniéndose los mejores resultados si se realiza la prueba sobre un cultivo en medio sólido de 3-4 horas.

b) Cocos grampositivos con disposición en parejas/cadenas (tipo estreptococo): se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre; en caso de sospecha de *Enterococcus* spp., se puede añadir un subcultivo en agar bilis esculina. Si la situación epidemiológica lo requiere, puede incluirse placas selectivas para detectar enterococos resistentes a vancomicina. Se realizarán las siguientes pruebas:

- Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS): puede identificarse el microorganismo implicado por este método, obteniéndose los mejores resultados si se realiza la prueba sobre un cultivo en medio sólido de 3-4 horas. Es importante considerar que este método puede no diferenciar bien *Streptococcus pneumoniae* de algunas especies de *Streptococcus* del grupo viridans
- Sistema de detección de antígenos proteicos para detección de la presencia de *Streptococcus pneumoniae*. Debido a los problemas de especificidad de estas técnicas, este resultado debe informarse como preliminar y confirmar siempre su resultado por técnicas clásicas.

c) Bacilos Gram positivos: se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre en caso de que el frasco sea aerobio y se incluirán medios sólidos para anaerobios si el frasco lo requiere. Se realizarán las siguientes pruebas:

- Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS): si el microorganismo tiene morfología de *Listeria* spp. o *Corynebacterium* spp, puede identificarse por este método, obteniéndose los mejores resultados si se realiza la prueba sobre un cultivo en medio sólido de 3-4 horas. Si se sospecha la presencia de *Clostridium* spp, debe intentarse las técnicas de concentración de las proteínas bacterianas mediante centrifugación del hemocultivo positivo.

d) Diplococos gramnegativos: se debe sospechar la presencia de *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae* por lo que se deben sembrar en placas de agar sangre y agar chocolate con incubación en estufa de 36°C (+/-1°C) con CO₂, incubando más tiempo las placas si son negativas a las 24 h. Extremar las medidas de bioseguridad. Ambos microorganismos pueden ser identificados adecuadamente por espectrometría de masas.

e) Bacilos gramnegativos: se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre y agar MacConkey. Si la situación clínica lo requiere se pueden incluir placas selectivas para detección rápida de entero-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 9 de 14

bacterias portadoras de betalactamasas de espectro extendido o carbapenemasas. También debe valorarse la presencia de bacterias anaerobias y si fuera posible, se deben incluir placas adecuadas para el aislamiento de estos microorganismos que deben ser incubadas en la atmosfera adecuada

- Se realizarán las siguientes pruebas:
 - Sistema de PCR a tiempo real para detección de la presencia de betalactamasas de espectro extendido y/o carbapenemasas si la situación clínica/epidemiológica del paciente lo aconseja.
 - Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS): puede identificarse el microorganismo implicado por este método, obteniéndose buenos resultados empleando técnicas de concentración de las proteínas bacterianas mediante centrifugación del hemocultivo positivo.

Si la tinción de Gram muestra la presencia de cocobacilos gramnegativos, se debe sospechar la presencia de *Haemophilus spp.* o *Brucella spp.* por lo que se debe incluir siempre la placa de agar chocolate, incubar más tiempo las placas si son negativas a las 24 h y extremar las medidas de bioseguridad. Ambos microorganismos pueden ser identificados adecuadamente por espectrometría de masas.

f) Microorganismos grampositivos y gramnegativos simultáneamente: se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre y un subcultivo adicional en placas de agar CNA (colistina + ácido nalidíxico) y agar MacConkey. Debe valorarse la presencia de bacterias anaerobias y si fuera posible, se deben incluir placas adecuadas para el aislamiento de estos microorganismos que deben ser incubadas en la atmosfera adecuada. No se debe realizar antibiograma hasta que no se logre el aislamiento de cada uno de los microorganismos implicados en el proceso

g) Levaduras: se realizará subcultivo en placa de agar chocolate/agar sangre y un subcultivo adicional en medios para hongos: agar Sabouraud cloranfenicol y CHROMagar *Candida*. En caso de visualización de hongos filamentosos, se hará un subcultivo adicional en medio para hongos: agar Sabouraud cloranfenicol con incubación a 30°C. Las levaduras pueden identificarse directamente del frasco mediante MALDI-TOF; obteniéndose buenos resultados empleando técnicas de concentración de las proteínas fúngicas mediante centrifugación del hemocultivo positivo.

7.3.5. Incubación y lectura de las placas de subcultivo

- Las placas de agar chocolate, agar sangre y CNA se incubarán en estufa de atmósfera enriquecida de CO₂. La lectura se realizará a las 18-24 h.
- Las placas de MacConkey, de hongos, agar bilis esculina y los antibiogramas preliminares en Mueller-Hinton se incubarán en estufa de atmósfera convencional. La lectura se realizará a las 18-24 h.
- Las placas para anaerobios se incuban en estufa de 36°C (+/-1°C) y atmósfera anaerobia. La lectura se realizará a las 48 h.

7.3.6. Procesamiento de microorganismos significativos

Los microorganismos aislados productores de bacteriemia significativa se identificarán de forma definitiva con los sistemas de identificación de que disponga el laboratorio y se les realizará estudio de sensibilidad de acuerdo con las normas del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Todos los microorganismos significativos se conservarán congelados en el cepario.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición Nº 01	Página 10 de 14

7.3.7. *Procesamiento de microorganismos contaminantes*

En general se consideran contaminantes los microorganismos que se indican a continuación, siempre que se aislen a partir de un solo hemocultivo o extracción. Para considerar que alguno de estos microorganismos causa bacteriemia significativa deben estar presentes con idéntico biotipo y antibiotipo en 2 o más hemocultivos o extracciones del mismo paciente y ser compatibles con su proceso clínico. En algunos pacientes, esta diferenciación es difícil de hacer y siempre se debe decidir dentro del equipo multidisciplinar que debe manejar estos procesos

- *Bacillus* spp.
- *Corynebacterium* spp. (excepto *C. jeikeium*)
- *Lactobacillus* spp.
- *Propionibacterium acnes* (o *Propionibacterium* spp.)
- *Staphylococcus* plasmocoagulasa negativa
- *Streptococcus* del grupo viridans
- *Clostridium perfringens*

7.3.8. *Procesamiento de viales positivos con tinción de Gram y subcultivos negativos*

Si a las 48 horas de incubación no se detecta crecimiento en los subcultivos, se volverá a pinchar el frasco original extraído y se repetirá todo el proceso. En caso de que los resultados vuelvan a ser negativos, la muestra se finalizará como negativa cuando se extraiga el otro vial de la misma muestra del sistema automático de incubación.

7.3.9. *Procesamiento de viales positivos por métodos basados en microbiología molecular*

De forma paralela a los métodos clásicos y con objeto de dar un tiempo de respuesta menor, pueden emplearse diferentes métodos, generalmente basados en PCR a tiempo a real multiplex o en microarrays que ofrecen datos sobre la etiología del proceso y sobre la presencia de algunos mecanismos importantes de resistencia. Como son métodos comercializados, deben seguirse estrictamente las recomendaciones del fabricante.

7.3.10. *Métodos rápidos de estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de los microorganismos aislados en frascos de hemocultivos*

Debido a la importancia clínica de disminuir el tiempo de respuesta, todos los laboratorios de Microbiología deben poner en marcha todas las técnicas de las que dispongan para ofrecer resultados rápidos tanto de la etiología del proceso como de la sensibilidad antibiótica de los microorganismos implicados. Además de las

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 11 de 14

herramientas no basadas en el cultivo, también se pueden realizar diferentes tipos de antibiogramas rápidos. Hay que tener en cuenta que ni el EUCAST ni el CLSI avalan estos protocolos, y los resultados de los mismos se deben informar siempre como preliminares y, posteriormente, se tienen que confirmar por los métodos habituales a partir de las colonias bacterianas aisladas en las placas de los subcultivos.

Para ello existen diferentes abordajes:

- a) Paneles de microdilución con lectura a las 18-24 h: se realizan habitualmente en la gran mayoría de los laboratorios, seleccionando los mismos en función de los resultados de la tinción de Gram. El problema radica en la dificultad de ajustar el inóculo bacteriano a las normas establecidas por el fabricante, pero en general se sustituye la colonia bacteriana por unas gotas de los hemocultivos positivos; otros laboratorios tratar de ajustar el inóculo a partir del sedimento obtenido tras la centrifugación del caldo del frasco del hemocultivo.
- b) Métodos rápidos de tiras de gradiente o sistemas disco-placa: tienen el mismo problema a la hora de ajustar el inóculo y también sus resultados deben ser confirmados. En algunos casos, si el microorganismo crece rápidamente se puede ofrecer una información muy preliminar de la sensibilidad de algunos antibióticos en menos de 8 horas, por lo que el médico responsable del paciente recibe la información en el mismo día en el que hemocultivo da positivo.
- c) Sistemas de microdilución con monitorización continua del crecimiento bacteriano: algunos sistemas realizan una monitorización continua del crecimiento bacteriano y cuando el algoritmo lo considera adecuado, ofrece un resultado preliminar sobre la resistencia del microorganismo a un determinado antibiótico. Los resultados van apareciendo en el sistema informático a partir de las 4-6 horas y aunque tampoco está validado por EUCAST, hay muchos trabajos que comunican una excelente correlación de estos datos con los considerados como patrón con el sistema Vitek (BioMerieux). Este sistema también aportaría información al médico responsable del paciente en el mismo día en que el hemocultivo da un resultado positivo.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. INFORME PRELIMINAR DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS TRAS TINCIÓN DE GRAM

El resultado de la tinción de Gram se registrará y se validará de modo definitivo en el sistema informático del laboratorio indicando el número de frascos que han dado positivo y se informará de forma urgente al médico responsable del paciente y al equipo multidisciplinar; también se informará del tiempo de positividad (horas transcurridas desde que el hemocultivo se introdujo en el incubador hasta que se detectó su positividad).

Los datos de todos los frascos positivos (número de registro, nombre del paciente, servicio y cama, número de hemocultivos positivos/número de hemocultivos extraídos y resultado de la tinción de Gram) serán registrados en la hoja de trabajo diaria del laboratorio. Es importante que quede registrado que se da la información telefónicamente y a quien se le da.

En caso de que la tinción de Gram sea negativa, se esperará a ver si hay crecimiento en las placas de subcultivo para validar la información de los resultados tanto en el sistema informático como telefónicamente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 12 de 14

8.2. INFORME PRELIMINAR DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS TRAS IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD PRELIMINAR

Cuando se realice la lectura de placas del subcultivo, la identificación directa a partir del frasco de hemocultivo positivo mediante técnicas rápidas o los antibiogramas preliminares se emitirá por medio del sistema informático un informe validado de forma preliminar con estos resultados, indicando dicha identificación presuntiva del microorganismo causante de la bacteriemia y el estudio preliminar de sensibilidad a antimicrobianos. Se añadirá el comentario “identificación definitiva y estudio de sensibilidad antibiótica en curso”.

Si el facultativo responsable considera que la información es relevante informará telefónicamente de este resultado al médico responsable del paciente.

8.3. INFORME DEFINITIVO DE HEMOCULTIVO POSITIVO

Una vez terminado el procesamiento de los hemocultivos, se validarán los resultados definitivos (quedando oculto el antibiograma preliminar si pudiera confundir al clínico a la hora de interpretar los resultados del paciente) en el programa informático del laboratorio de forma que:

- Si los dos frascos de una muestra han sido extraídos del sistema automático de incubación se dará por finalizada la muestra y se validará definitivamente.
- Si todavía queda un frasco de la muestra en el sistema automático de incubación se dará una validación preliminar dando por finalizada la identificación, pero no la muestra, en espera a que se extraiga el otro frasco del sistema de incubación.
- Los microorganismos considerados contaminantes no deben ser informados junto con su correspondiente antibiograma, aunque su estudio de sensibilidad quedará guardado en el sistema informático por si en algún caso fuese de utilidad. Opcionalmente, se puede informar el antibiograma preliminar. El microorganismo debe ir acompañado de un comentario en el que se haga referencia a su posible papel como contaminante, aunque indicando que todo aislamiento debe ser evaluado junto con los datos clínicos del paciente.

8.4. INFORME DE RESULTADOS NEGATIVOS

Los hemocultivos negativos permanecerán en incubación durante 5, 14 o 21 días según el protocolo establecido para cada caso. Transcurrido ese tiempo, si no se produce crecimiento de ningún microorganismo en ninguna de las parejas de frascos que constituyen la extracción del hemocultivo, generalmente se transmite esta información al sistema informático del laboratorio al que está conectado el incubador, y el facultativo validará el resultado informándolo como estéril o negativo indicando el periodo de incubación del frasco.

8.5. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

En el caso de los hemocultivos la realización del control de calidad es relativamente sencilla, ya que se trata de sistemas automatizados comerciales, por lo general ampliamente avalados por la bibliografía y por su uso en gran parte de laboratorios de Microbiología. En cuanto al tipo de muestra, hay un único tipo a considerar (la sangre) extraída por venopunción o por catéter.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición Nº 01	Página 13 de 14

Por lo que se refiere a la fase preanalítica, hay aspectos que no están bajo el control directo del laboratorio de Microbiología como la extracción de la sangre, la cumplimentación del volante u hoja de petición electrónica y el transporte de las muestras. Sin embargo, hay otros aspectos que si dependen del laboratorio de Microbiología como los criterios de aceptación o rechazo de muestras, el registro de solicitudes, la preparación de las muestras y su conservación. La elaboración de protocolos normalizados de trabajo en los que se detalle cómo debe realizarse el registro informático de las peticiones, cuáles son las condiciones idóneas de extracción, envío, transporte y conservación de las muestras, número e intervalo de extracción de los hemocultivos, el volumen de sangre para cultivar, la selección del tipo de frasco o medio de cultivo, etc. y su distribución entre los usuarios, así como la realización de reuniones informativas son aspectos fundamentales en el aseguramiento del sistema de calidad que se quiera implantar.

Es aconsejable que los procedimientos analíticos empleados hayan sido publicados en manuales reconocidos o en publicaciones avaladas por expertos internacionales/nacionales; en el caso de los hemocultivos, los sistemas automatizados que son empleados mayoritariamente en los laboratorios de Microbiología están avalados por numerosas publicaciones y por su uso en gran número de laboratorios de nuestro país, por lo que generalmente es suficiente realizar un procedimiento de verificación de un método que ya está validado para un sistema comercial de hemocultivos siguiendo las directrices de la norma UNE EN-ISO 15189 con el fin de “verificar” (comprobar las especificaciones del fabricante).

8.5.1. Procedimiento de control

Como control de calidad interno de rendimiento de la prueba, se realizará semestralmente el siguiente ensayo:

1. Utilizar de cultivos frescos de 18-24 h, de una de las cepas de referencia indicadas en la siguiente tabla.
2. Preparar una suspensión ajustada para alcanzar una turbidez comparable con un 0,5 de McFarland en suero fisiológico.
3. Inocular un frasco de hemocultivo con 1,0 mL de dicha suspensión.
4. Introducir el vial inoculado en el sistema de monitorización continua junto con un vial sin inocular.

El instrumento debe detectar el frasco inoculado como positivo en un plazo de tiempo de 72 h. El frasco no inoculado debería permanecer como negativo hasta la finalización del protocolo.

Este procedimiento de control interno, cada vez que se realice, se registrará en la hoja de Registro correspondiente, indicando la fecha y la firma de la persona que lo realiza.

ESPECIES	COLECCIÓN
<i>E. coli</i>	ATCC 25922
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853
Cepas de referencia empleadas por cada centro (ATCC, CECT..)	

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de hemocultivos	PNT-HMM-01	
		Edición N° 01	Página 14 de 14

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio (TEL) y/o enfermeros (DUE) serán los responsables de la recepción y registro de las muestras, así como de la comprobación de los datos de los pacientes y de las condiciones de envío de las mismas. Además, se encargarán de introducir y sacar los frascos del sistema automatizado del laboratorio, así como del procesamiento técnico de la muestra.

El facultativo a cargo del laboratorio de hemocultivos será responsable de la interpretación de los resultados, de la información preliminar verbal de los hemocultivos con sospecha de crecimiento significativo y de la emisión tanto preliminar como definitiva y validada de los resultados en el SIL (informe escrito).

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Los sistemas automatizados de monitorización continua de hemocultivos permiten determinar el momento en el que se produce el crecimiento de los microorganismos y es un dato útil para diferenciar contaminación del frasco de la verdadera infección. Además, en el estudio de la bacteriemia asociada a catéter, la comparación del tiempo diferencial de crecimiento entre la muestra obtenida a través del catéter y la obtenida a través de la sangre periférica, sirve para establecer el origen del proceso.
- Todos los frascos deben manejarse cumpliendo las normas de bioseguridad recomendadas, pero en caso de una sospecha de brucelosis u otros patógenos de nivel 3, debe indicarse claramente en la petición (e incluso en los frascos), y se debe ampliar el tiempo de incubación del hemocultivo en el sistema automatizado hasta 21 días, extremándose las precauciones en la manipulación de los frascos así como de las placas de subcultivo si resultaran positivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los sistemas automatizados empleados para el procesamiento de hemocultivos, no permiten detectar el crecimiento de algunas bacterias como *Francisella* spp., *Leptospira* spp., *Bartonella* spp. y *Mycoplasma* spp., parásitos ni virus; también presenta importantes limitaciones para el aislamiento de hongos filamentosos y dimórficos.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. Clin Microbiol Infect. 2013;19:513-520.
2. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. Clin Microbiol Infect. 2015;21:313-32.
3. Rodríguez JC, Bratos AM, Merino E, Ezpeleta C. Use of MALDI-TOF in the rapid diagnosis of sepsis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34 (Suppl 2):19-25.
4. Tziolos N, Giamarellos-Bourboulis EJ. Contemporary approaches to the rapid molecular diagnosis of sepsis. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16:1201-1207.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 12

PNT-HMM-02

Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 12

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir de una manera general el proceso de identificación de microorganismos mediante la técnica de MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption identification-time of flight mass spectrometry*) a partir de hemocultivos positivos. Este documento es aplicable a todos los laboratorios que realicen el procesamiento de hemocultivos positivos.

Es conveniente que cada laboratorio adapte la metodología a sus condiciones particulares. Actualmente existen dos equipos de MALDI-TOF de aplicación en la identificación de microorganismos que son MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) y VITEK MS (Biomerieux).

2. FUNDAMENTO

La espectrometría de masas es una técnica analítica tradicionalmente utilizada para identificar compuestos químicos. Desde los años 1970 se ha aplicado a la identificación de microorganismos, y en los últimos años la aparición de nuevas plataformas fáciles de usar e interpretar, ha permitido su uso en los laboratorios de Microbiología Clínica. En su formato MALDI-TOF MS, la técnica se basa en la ionización de las moléculas a analizar (proteínas en el caso de los microorganismos) mediante un haz de luz láser y su detección por un espectrómetro de masas. Para ello, los microorganismos deben ser tratados con una matriz orgánica que permita absorber la energía del láser. Las moléculas ionizadas generadas, son aceleradas por un campo eléctrico y adquieren un “tiempo de vuelo” distinto según su relación carga/masa. Finalmente, son detectadas en un espectrómetro de masas, que genera un espectro característico, que en principio es único para cada especie microbiana. Este espectro puede ser utilizado como “huella dactilar” para identificar un microorganismo mediante la comparación con los espectros recogidos en la base de datos del sistema para microorganismos patrón. Esta técnica no se puede aplicar a partir de la muestra de sangre por la escasa carga microbiana presente en estos procesos, pero es muy útil para identificar precozmente la etiología de la bacteriemia/fungemia. Existen dos abordajes, y el más usado en la práctica habitual utiliza directamente el hemocultivo positivo como fuente proteica y aporta información muy precoz, aunque no siempre se consigue identificar el agente etiológico, especialmente si en la tinción de Gram se observa la presencia de cocos grampositivos. Como alternativa, para aumentar la carga proteica, se puede realizar un subcultivo en medio sólido y tras un corto periodo de incubación de las placas (2-5 horas), aplicar la técnica sobre las microcolonias presentes.

En cualquier caso, cabe destacar que no existen protocolos estandarizados para el procesamiento de estas muestras y los procedimientos se deben evaluar y validar en la medida de lo posible por cada laboratorio, para lograr que se puedan identificar de forma precoz el mayor número de casos, ya que los datos de identificación aportados por esta técnica pueden ser fundamentales para el manejo clínico de estos pacientes.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Se utilizarán a dicho efecto los documentos facilitados por el fabricante del sistema MALDI-TOF MS disponible en cada laboratorio. Por ejemplo:

- Manual Maldi Biotyper 3.0
- FlexAnalysis Operator Manual
- Protocolo de procesamiento de hemocultivos
- Manual de bioseguridad del laboratorio

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 12

4.- MUESTRAS

Con el sistema MALDI-TOF MS se identifican microorganismos a partir de dos tipos de muestras fundamentalmente:

- 1) Microorganismos crecidos en medios sólidos procedentes de hemocultivos positivos (2-5 horas de incubación)
- 2) Hemocultivos positivos

La identificación por MALDI TOF aporta datos complementarios a las técnicas clásicas por lo que se debe asegurar la viabilidad y esterilidad de los cultivos durante su realización, así como el cumplimiento de las normas de bioseguridad aplicables en el manejo de este tipo de muestras.

5.- REACTIVOS

5.1. REACTIVOS

Para la realización de la técnica son necesarios los siguientes reactivos:

- Agua calidad HPLC (no sustituir por agua estéril).
- Etanol absoluto grado HPLC
- Ácido fórmico 100%
- Etanol al 70%
- Ácido trifluoroacético (TFA) al 80%
- Ácido fórmico al 70%
- Acetonitrilo al 50%
- Acetonitrilo 100%
- Bacterial Test Standard (BTS)
- Matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) (HCCA)
- Tween-80

5.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Etanol al 70%:

- Preparación de un litro: 700 ml de etanol absoluto y 300 ml de agua.
- Se utiliza para la limpieza de la placa metálica

2. Ácido trifluoroacético (TFA) al 80%

- Preparación de 1 ml: 800 microlitros de TFA y 200 microlitros de agua calidad HPLC; agitar en *vórtex*.
- Se utiliza para la limpieza de la placa metálica

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 12

3. Ácido Fórmico al 70%.

- Preparación de 1 ml: 700 microlitros de ácido fórmico (FA) y 300 µl de agua calidad HPLC. Agitar en *vórtex*. Nota: Reactivo corrosivo: manejar con guantes.
- Se utiliza para la extracción de proteínas.

4. Solvente orgánico (OS) (2,5% TFA, 50% acetonitrilo).

- Preparación de 1 ml: 475 microlitros de agua calidad HPLC, 500 microlitros de acetonitrilo y 25 microlitros de trifluoroacético (TFA). Agitar en *vórtex*. Nota: Reactivo corrosivo: manejar con guantes
- Se utiliza para reconstituir tanto la Matriz como el patrón (BTS).
- Existe la opción de adquirir un OS ya preparado con estas características.

5. Solución de MATRIZ (ácido α-Ciano-4-hidroxicinámico) (HCCA) (los viales liofilizados se almacenarán a temperatura de 2-8 °C).

- Preparación de la matriz: Añadir 250 µl de solvente orgánico (OS) a un tubo de MATRIZ liofilizada (tapón rojo). Agitar bien en *vórtex* durante 2-3 minutos hasta su completa disolución. Comprobar que no haya precipitados ni cristales. Si los hay, seguir agitando.
- La solución reconstituida se conserva a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Envolver con papel de aluminio para protegerlo de la luz.
- Se utiliza para absorber el exceso de radiación en el proceso.

6. Solución Bruker Bacterial Test Standard (patrón BTS) (almacenar a -20°C)

- Preparación del Bacterial Standard (tapón amarillo): Añadir 50 µl de solvente orgánico (OS) y homogeneizar bien mediante agitación. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente con el tubo cerrado y volver a homogeneizar. Centrifugar 1 minuto a 13.000 g.
- Hacer alícuotas de 10 µl y congelar a -20° C.
- Se utiliza como patrón en la calibración.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospita- tal.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 12

3. Ácido Fórmico al 70%.

- Preparación de 1 ml: 700 microlitros de ácido fórmico (FA) y 300 µl de agua calidad HPLC. Agitar en *vórtex*. Nota: Reactivo corrosivo: manejar con guantes.
- Se utiliza para la extracción de proteínas.

4. Solvente orgánico (OS) (2,5% TFA, 50% acetonitrilo).

- Preparación de 1 ml: 475 microlitros de agua calidad HPLC, 500 microlitros de acetonitrilo y 25 microlitros de trifluoroacético (TFA). Agitar en *vórtex*. Nota: Reactivo corrosivo: manejar con guantes
- Se utiliza para reconstituir tanto la Matriz como el patrón (BTS).
- Existe la opción de adquirir un OS ya preparado con estas características.

5. Solución de MATRIZ (ácido α-Ciano-4-hidroxicinámico) (HCCA) (los viales liofilizados se almacenarán a temperatura de 2-8 °C).

- Preparación de la matriz: Añadir 250 µl de solvente orgánico (OS) a un tubo de MATRIZ liofilizada (tapón rojo). Agitar bien en *vórtex* durante 2-3 minutos hasta su completa disolución. Comprobar que no haya precipitados ni cristales. Si los hay, seguir agitando.
- La solución reconstituida se conserva a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Envolver con papel de aluminio para protegerlo de la luz.
- Se utiliza para absorber el exceso de radiación en el proceso.

6. Solución Bruker Bacterial Test Standard (patrón BTS) (almacenar a -20°C)

- Preparación del Bacterial Standard (tapón amarillo): Añadir 50 µl de solvente orgánico (OS) y homogeneizar bien mediante agitación. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente con el tubo cerrado y volver a homogeneizar. Centrifugar 1 minuto a 13.000 g.
- Hacer alícuotas de 10 µl y congelar a -20° C.
- Se utiliza como patrón en la calibración.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospita- tal.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas
- Gradillas
- Microcentrífuga
- Agitador *vórtex*
- Congelador de -20°C
- Cabina de flujo laminar de nivel de bioseguridad adecuado
- Microflex LT bench top mass spectrometer (Bruker Daltonics)
- Placas de acero inoxidable con 96 pocillos para MALDI-TOF
- Criotubos de 1,5 ml
- Tubos de plástico estériles de 15 ml
- Asas estériles de siembra de 1 µl
- Puntas de pipeta con filtro
- Jeringuillas de 10 ml
- Agujas para jeringuillas de 10 ml

6.1. CALIBRACIÓN

Esta tarea se realizará cada vez que se reconstituya una nueva matriz. Su función es confirmar la corrección de los parámetros del equipo, los cuales son una condición previa para obtener espectros de calidad. Se utiliza un patrón que contiene una mezcla de proteínas conocidas (Bruker Bacterial Test Standard, BTS)

El proceso de calibración, tanto manual como automática, está detallado en Manual Maldi Biotyper 3.0, que se encuentra en versión pdf en el escritorio del ordenador conectado al MALDI-TOF. Esta calibración deberá realizarse semanalmente (ver Anexo I).

6.2 MANTENIMIENTO Y LIMPIEZA

El correcto mantenimiento y buen uso del aparato es básico para obtener resultados de calidad ya que es un aparato muy delicado y preciso.

El usuario tiene que hacer los siguientes procesos:

- 1.- El espectrómetro de masas se mantendrá siempre encendido para evitar que pierda el vacío y se evitarán movimientos y traslados del aparato debido a su extrema sensibilidad al movimiento.
- 2.- Se debe limpiar la junta de goma de la tapa antes del primer uso diario simplemente pasando un dedo sin guante por la superficie de la junta. En caso de que se observen motas de polvo o pelusas se limpiará con una torunda empapada en alcohol 70%.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospita- tal.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 12

3.- Se debe realizar periódicamente la limpieza de la placa metálica en la que se depositan las muestras; para ello:

- a.- Cubrir la placa con etanol 70%
- b.- Dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- c.- Frotar la placa con un papel suave bajo el grifo
- d.- Repetir los pasos a,b y c
- e.- Secar la placa
- f.- Dispensar 100 µl de Trifluoroacético al 80% (TFA) en la placa y frotar con un papel suave por toda la superficie de forma intensa. Realizar esta operación con guantes y sobre papel de filtro.
- g.- Dejar secar la placa al menos 15 minutos.

Además de todos estos procesos, se realizará periódicamente un mantenimiento preventivo del equipo por parte de la casa comercial

7. PROCESAMIENTO

7.1.- IDENTIFICACIÓN A PARTIR DE CULTIVOS EN MEDIO SÓLIDO

El procedimiento más empleado es:

- a. Con un asa de siembra estéril de 1 µl se deposita y se extiende una pequeña cantidad de colonia bacteriana en uno de los pocillos de la placa; este paso es clave para la obtención de buenos espectros y siempre se debe depositar una pequeña cantidad de colonia y distribuirse de manera uniforme en la placa. Se pueden procesar muchas muestras a la vez, una en cada pocillo de la placa.
- b. Añadir 1 µl de ácido fórmico al 70% en cada pocillo y dejar secar (este paso es opcional pero mejora el rendimiento ya que ayuda a que la célula se rompa completamente y se libere el contenido intracelular). Los protocolos de trabajo del VITEK MS sólo recomiendan la utilización de este compuesto para la identificación de levaduras
- c. Añadir 1 microlitro de matriz y dejar secar.
- d. Introducir la placa en el MALDI TOF.
- e. El espectrómetro busca cada posición previamente asignada en la placa y realiza una serie de disparos con el láser. El sistema permite a través de una cámara de video visualizar los pocillos y dirigir el láser a los puntos deseados. Tras los disparos del láser, se produce la ionización de la muestra y el detector registra la masa de los fragmentos resultantes. Con esta información genera un espectro, que se compara con la base de datos y proporciona una identificación del microorganismo presente en la muestra, acompañándolo de un score que nos indica la fiabilidad de la identificación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospita.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 12

Si con este sistema de extracción no se obtiene la identificación correcta, se puede realizar el siguiente procedimiento de extracción:

- a. Depositar la microcolonia en 300 µl de agua y agitar.
- b. Añadir 900 µl de etanol absoluto.
- c. Centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos y decantar el sobrenadante.
- d. Volver a centrifugar para eliminar los restos de etanol y dejar secar el pellet durante 2-3 minutos.
- e. Añadir 5-10 µl de ácido fórmico (70%) y la misma cantidad de acetonitrilo.
- f. Centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos y colocar 1 µl del sobrenadante en la placa.

7.2. IDENTIFICACIÓN A PARTIR DE HEMOCULTIVOS

Existen múltiples procedimientos publicados que tratan de optimizar el método, aunque no existe consenso sobre el protocolo a seguir. Se trata de separar las proteínas microbianas del resto de compuestos presentes en el frasco mediante diferentes sistemas. Se han empleado detergentes, saponinas, procesos de filtración, de centrifugación, etc. pero todavía no hay un sistema “casero” validado y avalado por las casas comerciales fabricantes de los aparatos.

La casa comercial Bruker recomienda la utilización del kit MALDI Sepsityper, que cuenta con marcado CE e IVD. El tiempo hasta obtención de resultados es de unos 30 minutos aproximadamente y el proceso a seguir es el siguiente:

- a.- Partir de 1 ml de hemocultivo positivo.
- b.- Añadir 200 µl de tampón de lisis.
- c.- Centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos.
- d.- Descartar el sobrenadante.
- e.- Añadir 1 ml de tampón de lavado.
- f.- Centrifugar a 15.500 g durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
- g.- Añadir 300 µl de agua calidad HPLC y 900 µl de etanol absoluto.
- h.- Centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el etanol.
- i.- Añadir 2-50 µl de ácido fórmico (70%) y la misma cantidad de acetonitrilo.
- j.- Centrifugar a 15.500 g durante 2 minutos y colocar 1 µl en la placa.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 12

Biomérieux también comercializa un sistema semejante denominado VITEK MS Blood Culture kit (RUO) diseñado para realizar el proceso de extracción a partir de hemocultivos positivos que vayan a ser procesados mediante VITEK-MS.

En relación con los métodos caseros, a continuación se describen algunos procedimientos que han proporcionado buenos resultados.

A) Procedimiento 1: se basa la separación de las proteínas bacterianas mediante centrifugaciones diferenciales; los pasos a seguir son:

- a.- Se extraen 8-10 ml de muestra del hemocultivo positivo y se centrifugan durante 10 minutos a unas 100 g para eliminar los restos de células sanguíneas presentes en la muestra.
 - b.- Se reparte el sobrenadante en 4 criotubos de 1,5 ml y se centrifugan durante 2 minutos a 15.500 g.
 - c.- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento de uno de los 4 tubos en 1 ml de agua HPLC. Esta suspensión servirá para la siguiente resuspensión del pellet del segundo tubo y así sucesivamente con los tubos restantes. Al final obtendremos un solo tubo en el que se encuentran los 4 pellets resuspendidos en 1 ml de agua.
 - d.- El tubo se centrifuga 2 minutos a 15.500 g. Se elimina el sobrenadante y con un asa de 1 µl se extiende aproximadamente ese volumen del pellet en uno de los pocillos de la placa de MALDI-TOF y con la misma asa y sin coger más cantidad de muestra, extender en un segundo pocillo. A partir de este punto se continúa el procedimiento siguiendo a partir del punto b del apartado 7.1
- Cuando este procedimiento no produce una identificación satisfactoria del microorganismo presente en la muestra, se realiza una extracción de proteínas siguiendo los pasos que se detallan a continuación:
- e.- Resuspender el pellet sobrante del paso anterior en 300 µl de agua HPLC y 900 µl de etanol absoluto. La suspensión se centrifuga a 15.500 g durante 2 minutos.
 - f.- El sobrenadante se elimina y se resuspende el pellet en 25-100 µl de ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo 100%. La cantidad de estos dos reactivos se calculará dependiendo de la cantidad de pellet.
 - g.- Se centrifuga la suspensión durante 2 min a 15.500 g y se coloca 1 µl de sobrenadante sobre un pocillo de la placa de MALDI-TOF. Dejar secar a temperatura ambiente. Después colocar 1 µl de matriz sobre la muestra y dejar secar.

B) Procedimiento 2: también está basado en centrifugaciones diferenciales:

- a.- Partir de 6 mililitros de hemocultivo positivo y centrifugar durante 10 minutos a 1.500 g para eliminar los restos celulares
- b.- Tomar 4 ml del sobrenadante y mezclarlo con 2 ml de agua
- c.- Centrifugar a 4.500 g durante 10 minutos
- d.- Resuspender el sedimento en 1 ml de agua
- e.- Centrifugar a 13.000 g durante 5 minutos
- f.- Colocar el sedimento en la placa

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 10 de 12

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. INTERPRETACIÓN

Una vez que el espectrómetro de masas ha obtenido los espectros correspondientes a cada una de las muestras analizadas, realiza una comparación con su base de datos y muestra un listado con los 10 microorganismos de espectro más parecido en orden decreciente y con los scores para cada una de las identificaciones.

El sistema Vitek MS (Biomérieux) compara el espectro obtenido con la base de datos y si el sistema experto considera el espectro de suficiente calidad, muestra la identificación del microorganismo; en cambio, el sistema comercializado por Bruker aporta tres categorías de resultados:

1. Muestras que obtienen un score (puntuación) por debajo de 1,7. El resultado no es fiable. Estas muestras están marcadas en el programa Maldi Biotyper 3.0 con un punto rojo.
2. Muestras con un score entre 1,7-1,9. En este caso, sólo la identificación del género es fiable, no así la de la especie. Maldi Biotyper 3.0 señala estas muestras con un punto amarillo.
3. Muestras con un score igual o superior a 2,0. La identificación de estas muestras es fiable hasta el nivel de especie. Vienen indicadas con un punto verde. En este caso, se debe considerar la identificación como correcta siempre que no haya varias especies con un score similar, en cuyo caso el sistema posiblemente no discrimina entre especies cercanas.

8.2. PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

Debe definirse el sistema de extracción de los hemocultivos que debe estar avalado por la literatura o por su utilización en muchos laboratorios de Microbiología. En cuanto al tipo de muestra, hay dos tipos, caldo de hemocultivo positivo o colonia crecida tras el subcultivo de éste.

Como control de calidad interno de rendimiento de la prueba, se realizará semanalmente el siguiente ensayo:

1. A partir de cultivos frescos de 18-24 h, de una de las cepas de referencia indicadas en la tabla 1
2. Inocular un hemocultivo e incubarlo según los procedimientos habituales. Cuando el instrumento detecte el frasco inoculado como positivo, realizar la identificación del microorganismo según los protocolos establecidos

Este procedimiento de control interno, cada vez que se realice, se registrará en la hoja de Registro correspondiente, indicando la fecha y la firma de la persona que lo realiza.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Identificación de microorganismos a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS (<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>)	PNT-HMM-02	
		Edición N° 01	Página 11 de 12

ESPECIES	COLECCIÓN
<i>E. coli</i>	ATCC 25922
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853
Cepas de referencia empleadas por cada centro (ATCC, CECT..)	

9. RESPONSABILIDADES

Tanto el personal técnico del área, así como los residentes y el/la facultativo/a del área deben tener los conocimientos teóricos y las habilidades prácticas necesarias para desarrollar la metodología descrita en este PNT.

Los facultativos de área y, eventualmente, los residentes, serán responsables de la interpretación de los resultados y de su traslado al correspondiente informe.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cada laboratorio debe validar los procedimientos caseros utilizados

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La capacidad de identificación del sistema depende de los microorganismos incluidos en su base de datos que está sujeta a actualizaciones lo que condiciona los parámetros de fiabilidad de la técnica.

Desde el punto de vista del análisis proteómico, hay microorganismos que pueden dar espectros muy semejantes (por ejemplo, *E. coli* y *Shigella* spp., *Streptococcus pneumoniae*/*Streptococcus mitis*) que el sistema no puede diferenciar. En estos casos el software del aparato proporciona una advertencia. La diferenciación de especies muy cercanas requiere un análisis exhaustivo y manual de los picos presentes en los espectros.

Es de especial importancia resaltar que aunque las últimas actualizaciones de las librerías han mejorado la diferenciación de *Streptococcus pneumoniae*, se sigue recomendando la confirmación de esta identificación por otros métodos.

