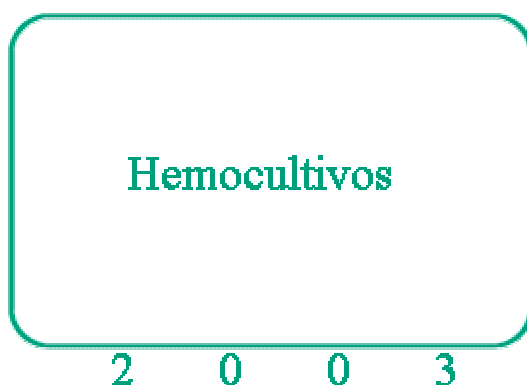


Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

3a.



Coordinadora: Elena Loza Fernández de Bobadilla

Autoras: Elena Loza Fernández de Bobadilla

Ana Planes Reig

Marta Rodríguez Creixems



ISBN: 84-609-2289-8

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTIFICO

1. Introducción

2. Bacteriemia

3. Indicaciones de los hemocultivos

4. Obtención de la muestra de sangre

4.1. Venopunción

4.1.1. Asepsia de la piel

4.1.2. Extracción de la muestra de sangre

4.2. Número e intervalo de las extracciones

4.3. Volumen y dilución de la sangre

5. Transporte del hemocultivo al laboratorio

6. Recepción y registro de los hemocultivos

6.1. Inspección inicial

6.2. Criterios de rechazo

6.3. Normas de seguridad

7. Procesamiento de los hemocultivos

7.1. Métodos de hemocultivos

7.1.1. Manuales

7.1.1.1. Convencional

7.1.1.2. Bifásico

7.1.1.3. Lisis-filtración

7.1.1.4. Lisis-centrifugación

7.1.1.5. Manométrico

7.1.2. Sistemas automáticos

7.1.2.1. Radiométricos y no radiométricos

7.1.2.2. Sistemas automáticos de monitorización continua

7.2. Hemocultivos positivos

7.2.1. Tinción de Gram y otras tinciones

7.2.2. Subcultivos

7.2.3. Identificación y antibiograma preliminares

7.2.4. Informe preliminar

7.2.5. Identificación e informe definitivo

7.3. Informe de los hemocultivos negativos

8. Interpretación de los resultados

9. Microorganismos y situaciones especiales

9.1. Brucelosis

9.2. Tularemia

9.3. Leptospirosis

9.4. Bartonelosis

9.5. Bacterias deficientes en pared

9.6. *Abiotrophia*

9.7. Bacterias dependientes de antibióticos

9.8. Micoplasmas

9.9. Micobacterias

9.10. Leishmaniasis

9.11. Hongos

9.12. Virus

9.13. Endocarditis

9.14. Bacteriemia asociada a catéter

10. Control de calidad

10.1. Manuales y normas

10.2. Análisis de los datos

11. Bibliografía

INDICE DEL DOCUMENTO TÉCNICO

- 1. Propósito y alcance**
- 2. Fundamento**
- 3. Documentos de consulta**
- 4. Toma de la muestra**
 - 4.1. Preparación del material
 - 4.2. Obtención de la sangre
 - 4.3. Envío de los hemocultivos al laboratorio
 - 4.4. Recepción y registro de los hemocultivos
- 5. Medios de cultivo, reactivos y productos**
 - 5.1. Medios de cultivo
 - 5.2. Reactivos
 - 5.3. Otros
- 6. Aparatos y material**
- 7. Procesamiento**
 - 7.1. Introducción de los hemocultivos en el sistema
 - 7.2. Extracción de los frascos sospechosos de crecimiento
 - 7.3. Procesamiento de los frascos positivos
 - 7.4. Lectura de placas e identificación de los microorganismos
 - 7.5. Procesamiento de los microorganismos significativos
 - 7.6. Procesamiento de los microorganismos contaminantes
 - 7.7. Procesamiento de los frascos negativos
- 8. Obtención y expresión de resultados**
 - 8.1. Informe preliminar de los hemocultivos sospechosos de crecimiento
 - 8.2. Informe de resultados positivos definitivos
 - 8.3. Informe de resultados negativos
- 9. Responsabilidades**
- 10. Anotaciones al procedimiento**
- 11. Limitaciones del procedimiento**
- 12. Bibliografía**

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

3a. HEMOCULTIVOS. 2003

Coordinador: Elena Loza Fernández de Bobadilla

**Autores: Elena Loza Fernández de Bobadilla
Ana Planes Reig
Marta Rodríguez Creixems**

1. INTRODUCCIÓN

En el año 1993 se publicó el número 3 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 para detectarlas, por lo que la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica ha considerado imprescindible revisar y poner al día este procedimiento teniendo en cuenta todos estos aspectos. Este 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.

2. BACTERIEMIA

La detección de la bacteriemia y la fungemia constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología Clínica, dada su importancia diagnóstica y pronóstica ya que se asocia con una elevada mortalidad que oscila entre el 20 y el 50%.

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 término fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre. Septicemia y sepsis son expresiones que se emplean para denominar el síndrome clínico con el que habitualmente se manifiestan las bacteriemias o las fungemias, independientemente del resultado de los hemocultivos, por lo que en numerosas ocasiones resultan confusas y no se utilizarán en este documento.

La bacteriemia y la fungemia son complicaciones graves de las infecciones bacterianas y fúngicas, respectivamente, y tienen una metodología diagnóstica 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...).

Las bacteriemias pueden ser transitorias, continuas o intermitentes según la forma en que aparecen los microorganismos en la sangre, pero esta distinción es difícil de establecer y poco práctica desde el punto de vista microbiológico. El término bacteriemia de "brecha" se emplea cuando ésta se presenta en un paciente que está recibiendo terapia sistémica con antimicrobianos a los cuales es sensible el microorganismo aislado. Su presencia

puede ser debida a una concentración inadecuada del antimicrobiano en la sangre, a un incorrecto drenaje del foco de infección, a la presencia de endocarditis o infección endovasular, al deterioro de las defensas del huésped, al desarrollo de resistencia al tratamiento antimicrobiano, etc.

La incidencia de la bacteriemia depende del tipo de población estudiada (5-30 casos por 1000 pacientes hospitalizados) y puede presentarse a cualquier edad, sobre todo en pacientes con graves enfermedades de base y en los sometidos a maniobras que alteran los mecanismos locales y generales de defensa frente a la infección. Los focos más frecuentes de bacteriemia son el tracto genitourinario, los abscesos, las heridas quirúrgicas, el tracto biliar y los catéteres intravasculares, aunque hasta en un 25% de los casos su foco originario es desconocido.

La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente circulatorio. En la actualidad los grampositivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los gramnegativos. Ello es debido a múltiples causas, entre las que destacan la utilización de antibióticos de amplio espectro, el uso generalizado de catéteres intravasculares y el empleo de métodos de diagnóstico invasores. Por otra parte, el aumento de pacientes inmunodeprimidos con tratamientos antineoplásicos o con infección por el VIH ha propiciado la aparición de bacteriemias por agentes que en el pasado eran causa muy rara de infección.

El diagnóstico definitivo de la bacteriemia 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 a la terapia empírica ya establecida. En ocasiones puede orientar el diagnóstico de enfermedades como la neoplasia de colon (asociada a bacteremia por *Streptococcus bovis*), endocarditis (estreptococos del grupo *viridans*) e incluso infección por el VIH (*Salmonella*, enterococo). Por otra parte, permite, en la mayoría de las ocasiones, la diferenciación de los casos de verdadera bacteriemia de aquellos en los que la positividad es debida a un inadecuado procedimiento de extracción y procesamiento.

3. INDICACIONES DE LOS HEMOCULTIVOS

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

esta sospecha incluyen fiebre o hipotermia (neonatos, ancianos), escalofríos, leucocitosis o granulocitopenia, deterioro uni o multiorgánico de etiología no aclarada, shock, compromiso hemodinámico de causa desconocida y combinaciones de algunos de ellos.

La extracción de hemocultivos está indicada, asimismo, en niños pequeños o ancianos con disminución súbita de la vitalidad, 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 otros fluidos como líquido cefalorraquídeo, orina, muestras del tracto respiratorio inferior o líquido sinovial en pacientes con sospecha de meningitis, pielonefritis, neumonía o artritis séptica, respectivamente.

4. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE

La probabilidad de que el resultado de los hemocultivos positivos representen una bacteriemia verdadera aumenta cuando la muestra se obtiene adecuadamente. Algunos estudios sugieren que el momento óptimo para la extracción de hemocultivos es exactamente antes del inicio de los escalofríos. Como este hecho es imposible de predecir con exactitud, se recomienda que la sangre para cultivo sea extraída lo antes posible después del comienzo de la fiebre y los escalofríos, o siempre que se sospeche una infección grave. No obstante, el momento de la extracción de la muestra de sangre es indiferente si la bacteriemia es continua como en la endocarditis u otras infecciones intravasculares y en las primeras semanas de la fiebre tifoidea o la brucelosis.

No ocurre lo mismo en la bacteriemia intermitente, que se presenta en diferentes infecciones, y en la bacteriemia transitoria, generalmente autolimitada y benigna, que suele producirse después de manipulaciones en superficies mucosas no estériles (procedimientos dentales o urológicos, endoscopias), en tejidos infectados (abscesos, forúnculos, celulitis) o en cirugía de áreas contaminadas. En ambos casos, que constituyen la mayoría de las bacteriemias, la muestra de sangre debe extraerse lo más cerca posible del pico febril.

4.1. VENOPUNCIÓN

La muestra de sangre para hemocultivo debe extraerse de una vena, utilizándose generalmente las del antebrazo. La utilización de sangre arterial no ha demostrado ventajas sobre la venosa. La extracción no debe realizarse a través de catéteres intravenosos o intaarteriales, salvo en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter (apartado 9.14). Cada muestra de sangre se obtendrá de lugares de venopunción diferentes.

4.1.1. Asepsia de la piel.

El principal problema para la interpretación correcta

de los hemocultivos es su contaminación con la microbiota cutánea durante la extracción. Para evitarla debe prepararse antes meticulosamente la piel de la zona de extracción. Después de la palpación de la vena elegida para la punción se limpiará la zona con alcohol isopropílico o etílico de 70° durante 30 segundos. Se aplicará a continuación una solución yodada (tintura de yodo al 1-2% durante 30 segundos o povidona yodada al 10% durante 1 minuto) cubriendo un área circular de 2-4 cm de diámetro. Es importante dejar secar el compuesto yodado para que ejerza su acción oxidante y evitar tocar con los dedos el lugar de la venopunción, así como hablar o toser mientras se realiza la extracción. En pacientes alérgicos a los compuestos yodados se deben realizar dos limpiezas con alcohol isopropílico.

Con una técnica aséptica correcta, el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3%. En general, se consideran microorganismos contaminantes *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. y otros que forman parte de la microbiota de la piel, siempre que su presencia no se repita en más de una muestra por paciente.

4.1.2. Extracción de la muestra de sangre.

Antes de proceder a la extracción se limpiarán los tapones de los frascos de hemocultivo con un antiséptico que se dejará secar para evitar su entrada en el interior del frasco al inocular la sangre. Se ha demostrado que la introducción de pequeñas cantidades de antiséptico en el frasco puede inhibir el crecimiento bacteriano. A continuación se insertará la aguja en la vena elegida y se extraerá el volumen de sangre sin utilizar anticoagulante. No debe ponerse algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de sacarla de la vena. Los frascos de hemocultivo deben inocularse rápidamente para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesándolos con la aguja en posición vertical. Diferentes estudios demuestran que el cambio de agujas no disminuye la tasa de contaminación y aumenta el riesgo de pinchazo accidental y otros sugieren lo contrario. Se inoculará en primer lugar el frasco anaerobio, evitando la entrada de aire, seguido del aerobio, invirtiéndolos varias veces para mezclar la sangre y el medio de cultivo.

4.2. NÚMERO E INTERVALO DE LAS EXTRACCIONES

Se considera una extracción para hemocultivo a la sangre extraída de una única venopunción, independientemente de los frascos en los que sea inoculada, habitualmente dos (aerobio y anaerobio). El número de extracciones considerado óptimo para la documentación de un episodio de bacteriemia es de 2 a 3, utilizando siempre lugares diferentes de venopunción. De este manera logran detectarse más del 95% de las bacteriemias. Un mayor número de extracciones es desaconsejable desde el punto de

vista coste/beneficio e incrementa innecesariamente el trabajo del laboratorio. No obstante, en los pacientes con sospecha de endocarditis sobre prótesis, donde puede ser difícil interpretar el aislamiento repetido de estafilococos coagulasa negativa, o en casos de endocarditis con hemocultivos inicialmente negativos que pueden ser debidos a microorganismos de difícil crecimiento, puede ser útil la disponibilidad de un número mayor de extracciones.

La extracción debe realizarse lo antes posible después de la aparición de los síntomas (fiebre, escalofríos...) teniendo en cuenta que las bacterias son eliminadas rápidamente de la sangre por las células del sistema reticuloendotelial. Por esta misma razón no se recomiendan extracciones separadas por periodos de tiempo concretos, al contrario, un estudio ha demostrado que se obtienen similares resultados cuando se extraen los hemocultivos simultáneamente que cuando se extraen separados por periodos de tiempo arbitrarios durante 24 horas.

Aunque la bacteriemia asociada a la endocarditis se suele acompañar de una baja cantidad de microorganismos en la sangre, diversos estudios demuestran que no es necesario un número mayor de hemocultivos que el recomendado para diagnosticarla.

Siempre que sea posible, las extracciones deben realizarse antes de la administración de antimicrobianos.

4.3. VOLUMEN Y DILUCIÓN DE LA SANGRE

De todas las variables que influyen en el aislamiento de una bacteria u hongo en un hemocultivo, el volumen de sangre cultivada es la más importante debido al bajo número de microorganismos presentes en la mayoría de las bacteriemias. La mayor parte de los escasos recuentos realizados muestran cifras próximas a 10 UFC/ml de sangre o inferiores y muy rara vez se superan 100 UFC/ml. En niños las cifras son muy variables. Se han descrito recuentos superiores a 1.000 UFC/ml en bacteriemias por *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis* y por el contrario bacteriemias con escasísimo número de microorganismos.

El volumen recomendado por cada venopunción en adultos es de 10 ml, ya que con volúmenes menores se ha demostrado una disminución del índice de positividad. Se considera que el índice de positividad aumenta entre el 3-5% por cada mililitro adicional de sangre cultivada. Sin embargo, la recomendación de elevar el volumen de sangre por extracción no se aplica, en cierta medida por la anemia que se puede provocar al paciente y para mantener la proporción de volumen sangre/medio de cultivo.

En neonatos y niños, se ha preconizado que la mayor cantidad de bacterias presentes en sangre

permite que con volúmenes considerablemente menores, incluso inferiores a 1 ml, se obtengan resultados aceptables y comparables a los de los adultos. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que la bacteriemia de bajo nivel es muy común en la población pediátrica y que el volumen de sangre para detectarla debe ser proporcional al peso (al volumen de sangre total) y a la edad. Se recomienda cultivar un volumen de sangre aproximadamente del 4,5% del volumen total de sangre del paciente.

La dilución de la sangre en el medio de cultivo es necesaria para neutralizar sus propiedades bactericidas. En los pacientes en tratamiento con antimicrobianos esta dilución permite, además, conseguir que la presencia de éstos se reduzca hasta alcanzar concentraciones subinhibitorias. La dilución final recomendada es de 1/5 a 1/10 (volumen/volumen) ya que diluciones <1/5 reducen la positividad.

5. TRANSPORTE DEL HEMOCULTIVO AL LABORATORIO

Cada hemocultivo o extracción (dos frascos) con la sangre inoculada debe ser debidamente identificado con los datos del paciente (número de historia clínica, nombre y apellidos, servicio, planta, número de cama), así como el nombre del médico que lo solicita, el diagnóstico del paciente, el tratamiento antimicrobiano que está recibiendo y el tipo de análisis que se requiere (hemocultivo convencional o para microorganismos de crecimiento lento). También se hará constar el número de teléfono del control de enfermería en el que se encuentre ingresado para poder informar los resultados preliminares de los hemocultivos en caso de positividad. Si los hemocultivos se extraen en el Servicio de Urgencias y el paciente es dado de alta, se anotará el número de teléfono donde pueda ser localizado en caso de positividad del hemocultivo.

Los frascos, con su debida identificación, deben transportarse al laboratorio inmediatamente. Sólo deben mantenerse a temperatura ambiente durante cortos periodos de tiempo para no afectar la posterior recuperación de los microorganismos. Si no pueden ser enviados inmediatamente al laboratorio se incubarán en una estufa a 35-37°C hasta ese momento. Los hemocultivos que van a ser procesados en sistemas automáticos pueden mantenerse a temperatura ambiente o a 35-37°C. El tiempo máximo que pueden permanecer a temperatura ambiente antes de ser introducirlos en el sistema no ha sido definido con exactitud, pero nunca debe superar las 18 h. Si han sido incubados a 35-37°C, deben ser introducidos en los aparatos automáticos antes de que transcurran 12 h. En los casos en que la introducción de un hemocultivo en un sistema automático se demore más de 18 h, sobre todo si ha estado incubado a 35-37°C, debe realizarse un subcultivo ciego para evitar un posible

resultado falso negativo. Ello es debido a que los microorganismos pueden haber crecido hasta llegar a la fase de meseta y no ser detectados por el sistema. Los hemocultivos nunca deben ser refrigerados.

6. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LOS HEMOCULTIVOS

6.1. INSPECCIÓN INICIAL

En cuanto se reciben los hemocultivos en el laboratorio, y antes de ser introducidos en los aparatos automáticos, los hemocultivos deben ser examinados cuidadosamente para comprobar que pueden ser manejados con seguridad, que estén íntegros, sin roturas o fisuras, que su identificación es correcta, que el volumen de sangre es adecuado y para detectar macroscópicamente signos de crecimiento. Si éstos últimos no existen, los frascos se introducirán rápidamente en los aparatos automáticos para evitar el retraso en el crecimiento de los microorganismos.

6.2. 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 serias dudas en cuanto a la identificación de la muestra o los frascos estén dañados y contaminados. En el caso de graves deficiencias en el envío de la muestra se contactará con el servicio que la remite para solucionarlas y después se procesará. Los hemocultivos aceptados para ser procesados se registrarán en el sistema informático utilizado por el laboratorio.

6.3. NORMAS DE SEGURIDAD

Existe un significativo riesgo biológico para el personal sanitario derivado de la extracción, transporte, manejo y eliminación de los hemocultivos, sobre todo por la manipulación de las agujas. El personal por lo tanto deberá seguir de manera estricta las normas contenidas en el Manual de Seguridad del Laboratorio de Microbiología Clínica (ver Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Nº 10: Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica).

7. PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. MÉTODOS DE HEMOCULTIVOS

En el procedimiento número 3 referido anteriormente se describía exhaustivamente el método convencional (manual) de procesamiento de hemocultivos basado en el sistema de dos frascos descrito a mediados del siglo pasado. En la actualidad, aunque el concepto básico sigue siendo el mismo, se han desarrollado nuevos métodos cuya descripción es el objetivo de este nuevo

procedimiento. Por todo ello, se reseñará someramente el método manual para detallar más ampliamente los nuevos sistemas automáticos.

7.1.1. Métodos manuales

7.1.1.1. Convencional. Es un método técnicamente muy simple que se basa en la observación macroscópica de los signos de crecimiento de una pareja de frascos con medio de cultivo líquido en los que se ha inoculado la sangre del paciente. Existe una amplia variedad de medios de cultivo. Los más frecuentemente utilizados son caldo triptosa soja, Columbia, infusión cerebro corazón, *Brucella*, tioglicolato y caldo de peptona suplementado y en ocasiones medios con resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico previo. Estudios comparativos han demostrado que no existe un medio de cultivo que pueda considerarse superior a todos los demás.

Los frascos de hemocultivo llevan incorporado un anticoagulante, la mayoría SPS (polianetol sulfonato sódico) a una concentración del 0,006 al 0,050%, que inhibe la actividad bactericida del suero humano y puede dificultar el crecimiento de algunos microorganismos como *Neisseria* spp.

El medio de cultivo se embotella al vacío con una atmósfera que contiene cantidades variables de CO₂. El potencial de óxido-reducción del medio, si no se ventila, es lo suficientemente bajo como para permitir el crecimiento de bacterias anaerobias. Uno de los dos frascos, después de la inoculación, se ventila por medio de una aguja, permitiendo la entrada de oxígeno atmosférico en su interior y la creación de una atmósfera aerobia. La temperatura de incubación oscila entre los 35° y los 37°C, la que más se aproxima a la temperatura corporal y la que demuestra un mayor aislamiento de microorganismos durante un período más corto.

La mayoría de los potenciales patógenos responsables de bacteriemia se aísla en los hemocultivos entre las 18 y 72 horas siguientes del inicio de su incubación. Más del 95% de los microorganismos se aíslan durante la primera semana, lo que motiva que se mantenga la incubación durante 7 días. Existen, no obstante, algunos patógenos y situaciones en los que se precisa más tiempo para su crecimiento como los hongos, microorganismos del género *Brucella* y algunos microorganismos causantes de endocarditis (*Cardiobacterium*, *Eikenella*...) por lo que, ante la sospecha de cualquiera de estas circunstancias, se prolonga la incubación hasta 4 semanas.

Los frascos se observan diariamente para detectar signos visibles de crecimiento bacteriano como el enturbiamiento del medio, la hemólisis de los hematíes, la producción de gas o la formación de colonias en el fondo del frasco. No obstante, sólo se detecta crecimiento macroscópico a partir de 10⁷ UFC/ml.

El problema de la detección macroscópica,

además del retraso, estriba en la presencia de falsos positivos y falsos negativos. Hay causas ajenas al crecimiento bacteriano que pueden enturbiar el medio o hemolizar los hematíes y, por el contrario, hay microorganismos que pueden crecer sin producir ningún signo macroscópico de crecimiento. Ello obliga a complementar la visualización macroscópica con el examen microscópico.

La técnica microscópica más utilizada es la tinción de Gram. Con ella pueden visualizarse microorganismos cuando su concentración se aproxima a los 10^5 UFC/ml. Debido a que consume una importante cantidad de tiempo, puede ser sustituida por la tinción con naranja de acridina, con la que contrastan mejor las bacterias con el fondo y se visualizan los microorganismos con concentraciones bacterianas de 10^4 UFC/ml. La detección del crecimiento con naranja de acridina es más rápida y permite obviar el subcultivo ciego rutinario tras las primeras 18-24 horas de incubación. A los 7 días de incubación, justo antes de desechar los frascos como negativos, se realizará un subcultivo ciego. El examen microscópico de los hemocultivos sin signos de crecimiento ha demostrado ser de poco valor.

7.1.1.2. Bifásico. Castañeda, en los años 40, introdujo un frasco con un medio bifásico compuesto de una fase sólida y otra líquida. Al inclinar el frasco, el medio líquido cubre totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo en el mismo cuantas veces se desee, sin necesidad de abrir la botella. Este medio supuso un significativo avance en el rendimiento de los aislamientos de *Brucella* spp.

Posteriormente se han introducido variaciones de este sistema como el Septi-Check® (Hoffman-La Roche) y el Opticult® (Becton-Dickinson). Los frascos se inoculan con la sangre y a su llegada al laboratorio se abre el tapón y se sustituye éste por un cilindro roscado que contiene distintas superficies con diferentes tipos de agar. Cada día, al inspeccionar el frasco, se invierte éste para hacer que la sangre y el caldo bañen el agar y realizar así un subcultivo.

Con este procedimiento la detección de bacterias y hongos es tan buena o mejor que con el método convencional y más rápida. Por el contrario, tiene el inconveniente de no permitir un adecuado aislamiento de anaerobios, ya que ha de abrirse la botella para la colocación del mencionado cilindro. Necesita, por tanto, ser complementado con un frasco con atmósfera anaerobia que garantice el aislamiento de anaerobios.

7.1.1.3. Lisis-filtración. En este método, tras la lisis de las células sanguíneas, se procede a filtrar la sangre para retener las bacterias. El filtro utilizado, o fragmentos del mismo, se siembra en distintos medios de cultivo.

Las técnicas de lisis-filtración han sido utilizadas desde hace muchos años y el mejor resumen de su situación actual lo representa el hecho de que

todavía no han llegado a ser introducidas en el mercado. Ello es debido a que, junto a un indudable rendimiento, requieren un elevadísimo tiempo de manejo en el laboratorio, lo que las hace irrealizables con carácter rutinario.

7.1.1.4. Lisis-centrifugación. 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 los microorganismos y los elementos sanguíneos, se centrifuga el tubo a 3.000xg durante 30 minutos. Después se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en distintos medios de cultivo.

Con el sistema Isolator® se consigue una mayor recuperación de microorganismos y más rapidez que con los métodos convencionales. Detecta más y con mayor rapidez la presencia de levaduras que cualquier otro sistema. Sus mayores inconvenientes derivan de la necesidad de procesar cada muestra individualmente y dentro de los 30 minutos posteriores a su extracción, de su laborioso manejo y de la alta incidencia de contaminaciones que genera. El sistema es caro y por todo ello no es una alternativa a otros métodos, pero es complementario de ellos, por las ventajas apuntadas y por la facilidad con la que el sistema permite hacer recuentos del número de colonias presentes en sangre, dato que se utiliza cada vez más en el diagnóstico de las bacteriemias relacionadas con catéteres intravasculares.

7.1.1.5. Manométrico. El método manométrico es el empleado por el sistema Signal® (Oxoid). Consta de una botella con caldo de cultivo a la que, una vez inoculada, se le acopla una pequeña cámara con una aguja que llega hasta el fondo del medio líquido. La producción de gas durante el crecimiento bacteriano provoca un aumento de la presión dentro de la botella que desplaza el medio de cultivo líquido a través de la aguja introduciéndose dentro de la mencionada cámara. La presencia de medio de cultivo en la cámara, por tanto, indica crecimiento bacteriano de manera rápida y sencilla. Su rendimiento es variable según los estudios, pero su principal inconveniente son los falsos positivos, que se pueden reducir calentando los frascos previamente. Agitando los frascos los 2 primeros días se aumenta la tasa de recuperación de microorganismos.

7.1.2. Sistemas automáticos

7.1.2.1. Radiométrico y no radiométricos. El Bactec 460® (Becton Dickinson) radiométrico fue el primer sistema comercial de hemocultivos automático. Utiliza substratos marcados con ^{14}C que al ser metabolizado por los microorganismos libera $^{14}\text{CO}_2$ al

medio, que difunde a la atmósfera del frasco. En esta atmósfera se mide periódicamente el nivel de $^{14}\text{CO}_2$ y se expresa como un índice de crecimiento cuando se compara con los niveles de CO_2 en frascos de control. La lectura está totalmente automatizada y se realiza por medio de una cabeza móvil provista de dos agujas que perforan los tapones de goma de los frascos. Su principal inconveniente es el manejo y posterior eliminación de los residuos radiactivos. En la actualidad ha sido superado por otros sistemas y sólo se utiliza para el cultivo de micobacterias.

Los sistemas Bactec NR-660® y NR-730® no radiométricos, muy parecidos al anterior, detectan el CO_2 por espectrometría de infrarrojos. Utilizan un agitador para los frascos aerobios en las primeras 24-48 h. Se recomiendan dos lecturas diarias los primeros 3 días y una lectura diaria hasta que se cumplan 5-7 días. Estos sistemas han sido desplazados por los de monitorización continua.

7.1.2.2. Sistemas automáticos de monitorización continua. En los últimos años se han introducido varios sistemas comerciales que, eliminando toda manipulación, realizan agitación continua de los frascos, monitorización continua con notificación inmediata de los resultados positivos y utilizan técnicas no invasoras para la lectura. Los que se describen a continuación son los más ampliamente utilizados. Se basan en la detección de la producción de CO_2 por los microorganismos y difieren en el método de detección de éste, en la capacidad de los frascos, en el tipo de medio de cultivo utilizado, en la frecuencia de lectura y en la capacidad máxima de los incubadores (ver detalles en las **tablas 1, 2 y 3**). Los datos obtenidos en cada lectura se transmiten a un ordenador donde se almacenan y se analizan según sofisticados algoritmos que determinan cuándo se produce crecimiento bacteriano, a la vez que minimizan el número de falsos positivos y falsos negativos. Todos los sistemas han demostrado su utilidad en la detección de la bacteriemia.

El Bactec-9240® (Becton Dickinson) es un sistema totalmente automático, no invasor, de agitación continua, que se compone de un incubador, un detector y un ordenador. El CO_2 producido por el metabolismo bacteriano reacciona con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del hemocultivo, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO_2 producida por el microorganismo. Esta medida es interpretada por el sistema de acuerdo con unos parámetros programados. Este sistema realiza una lectura de todos los frascos cada 10 minutos y mediante un sistema luminoso de alarma indica los frascos positivos detectados en cada lectura.

El BacT/Alert® (Organon Teknica) fue el primer sistema comercial no invasor de agitación y monitorización continua de cada frasco. Detecta el aumento y/o nivel total de CO_2 producido por el

crecimiento microbiano utilizando un sensor colorimétrico interno pegado al fondo de los frascos. A medida que cambia el color del sensor, la cantidad de luz reflejada se incrementa y es cuantificada como un aumento del voltaje. Las señales se analizan en un ordenador por medio de un algoritmo que utiliza tres criterios como evidencia de crecimiento. La lectura se realiza cada 10 minutos.

El sistema Vital® (bioMérieux) difiere de los anteriores en que incorpora un indicador fluorescente en el medio de cultivo. Como consecuencia del metabolismo microbiano se producen cambios en el pH, en el potencial redox o en el nivel de CO_2 que provocan una disminución de la fluorescencia del indicador. Esta fluorescencia se lee cada 15 minutos por medio de un detector diodo/fotón luminescente no invasor. Algunos trabajos han demostrado una cierta dificultad de este sistema en la detección de las levaduras.

El ESP® (Difco Laboratories) es un sistema automático no invasor en el que los frascos se colocan en cajones y los de anaerobios no se agitan. Monitoriza cada frasco cada 12 minutos y el crecimiento se mide por un método manométrico que detecta el consumo y/o la producción de gas.

7.2. HEMOCULTIVOS POSITIVOS

7.2.1. Tinción de Gram y otras tinciones

Cuando, por el método convencional, en un hemocultivo se observan signos de crecimiento, o los sistemas automáticos lo señalan como positivo, inmediatamente deben aspirarse asépticamente de 3 a 5 ml de caldo del frasco, introducirlos en un tubo estéril y depositar una gota en un portaobjetos para realizar una tinción con la técnica de Gram (ver **tabla 4**). Si no se observan microorganismos puede ser útil realizar una segunda tinción con naranja de acridina que es capaz de detectar un número menor de bacterias. Esta técnica ha demostrado su utilidad en bacteriemias por *Brucella* y *Campylobacter*.

7.2.2. Subcultivos

El material aspirado, independientemente del resultado obtenido en la tinción de Gram, debe ser subcultivado en distintos medios (agar sangre, agar chocolate y agar sangre enriquecido) que se incubarán a 35-37°C en diferentes atmósferas (aerobia, con 5% de CO_2 y anaerobia, respectivamente) y períodos de tiempo (24 h el agar sangre y el agar chocolate, y 48-72 h el agar sangre enriquecido en anaerobiosis). En ocasiones puede ser necesaria la incubación del agar chocolate 48 h. Teniendo en cuenta la morfología de los microorganismos observada en la tinción de Gram se deben realizar, además, subcultivos en medios específicos, por ejemplo, en agar Sabouraud si se observan levaduras, e incubar a diferentes temperaturas, 30°C en caso de sospecha de hongos.

7.2.3. Identificación y antibiograma preliminares

Con objeto de obtener resultados lo antes posible, se deben realizar pruebas de identificación

Tabla 1. Sistemas comerciales automáticos de hemocultivos

Sistema	Indicador del crecimiento	Mecanismo de detección	Monitorización continua
Bactec 460	Producción de CO ₂	Radiométrico	No
Bactec 660	Producción de CO ₂	Infrarrojos	No
Bactec-9240	Producción de CO ₂	Fluorescencia	Sí
BacT/Alert	Producción de CO ₂	Colorimétrico	Sí
Vital	Producción de CO ₂ , cambio de pH o potencial redox	Fluorescencia	Sí
ESP	Producción y/o consumo de gas	Manométrico	Sí

Tabla 2. Características de los sistemas automáticos de monitorización continua de hemocultivos

Sistema	Nº de frascos por unidad	Máximo unidades (frascos)	Frecuencia lectura (minutos)	Tipo de agitación/ velocidad
Bactec-9240	240	5 (1200)	10	Balanceo/30 ^a
BacT/Alert	120-240	6 (1440)	10	Balanceo/34 ^a
Vital	200-400	3 (1200)	15	Sinusoidal/150 ^a
ESP	128-384	5 (1920)	12 (aerobios) 24 (anaerobios)	Rotación/160 ^b

a: Ciclos/minuto.

b: Revoluciones/minuto.

Tabla 3. Características de los frascos utilizados por los sistemas automáticos de hemocultivos

Sistema	Caldo de cultivo ^a	Volumen de caldo (ml)	Volumen de sangre recomendado (ml)	Dilución	Atmósfera	Ventilación requerida	Concentración/anticoagulante ^b
Bactec-9240							
Aerobio/F	SCD	40	5	1:8	CO ₂ + aire	No	0,025%/SPS
Anaerobio/F	SCD	40	5	1:8	CO ₂ + N ₂	No	0,025%/SPS
Plus Aerobio/F	SCD	25	10	1:2,5	CO ₂ + aire	No	0,050%/SPS
Plus Anaerobio/F	SCD	25	10	1:2,5	CO ₂ + N ₂	No	0,050%/SPS
PEDS Plus/F	SCD	40	0,5-3	1:80-1:13,3	CO ₂ + aire	No	0,020%/SPS
Litic/10 Anaerobio/F	SCD	40	10	1:4	CO ₂ + N ₂	No	0,035%/SPS
BacT/Alert							
Aerobio	SCD	40	10	1:4	CO ₂ + aire	Sí	0,035%/SPS
Anaerobio	SCD	40	10	1:4	CO ₂ + N ₂	No	0,035%/SPS
Pedi-BacT	BHI	20	4	1:5	CO ₂ + N ₂	Sí	0,020%/SPS
FAN Aerobio	BHI	40	10	1:4	CO ₂ + aire	Sí	0,050%/SPS
FAN Anaerobio	BHI	40	10	1:4	CO ₂ + N ₂	No	0,050%/SPS
Vital							
Aerobio	SCP	40	10	1:4	CO ₂ + mezcla O ₂	No	0,025%/SPS
Anaerobio	SCP	40	10	1:4	CO ₂ + mezcla N ₂	No	0,025%/SPS
ESP							
Aerobio 80A	SCP	80	10	1:8	CO ₂	No	0,006%/SPS
Anaerobio 80N	PP	80	10	1:8	CO ₂ + N ₂	No	0,070%/TSC
EZ DRAW 40A	SCP	40	5	1:8	CO ₂	No	0,006%/SPS
EZ DRAW 40N	PP	40	5	1:8	CO ₂	No	0,070%/TSC

a: SCD: Caldo soja-caseína; BHI: Caldo cerebro-corazón; SCP: Caldo peptona soja-caseína; PP: Proteosa-peptona.

b: SPS: Polianetol sulfonato sódico; TSC: Citrato trisódico.

Tabla 4. Identificación preliminar de microorganismos de hemocultivos basada en la tinción de Gram

Tinción de Gram		Identificación preliminar
Cocos	Gram (+) en racimos	TSI, DNAsa o coagulasa, novobiocina, antibiograma en agar Mueller Hinton
	Gram (+) en diplos o cadenas	Optoquina, bacitracina, bilis-esculina, antibiograma en agar sangre
	Gram (-)	Antibiograma en agar chocolate incubado en CO ₂ (<i>Neisseria</i>)
Bacilos	Gram (+) y corineformes	Esculina, antibiograma en agar sangre
	Gram (-)	Pruebas bioquímicas de identificación, antibiograma en agar Mueller Hinton
Cocobacilos	Gram (-)	Antibiograma en agar chocolate incubado en CO ₂ (<i>Haemophilus</i>)
Levaduras		Agar Saboureaud+cloranfenicol, agar Saboureaud+cloranfenicol+cicloheximida
Flora mixta	Gram (+) y Gram (-)	Agar sangre+ácido nalidíxico, agar MacConkey

presuntiva partiendo del caldo aspirado. Cuando se trata de bacteriemias monomicrobianas (la mayoría de las veces), dichas pruebas rápidas suelen dar resultados comparables con los que aporta la identificación definitiva en más del 90% de los estudios y en un tiempo incluso de 4 horas. En el caso de que la tinción de Gram demuestre la presencia de bacterias grampositivas la morfología de las mismas tiene un alto valor predictivo.

Al tiempo que se procede a la identificación, a partir del caldo de cultivo también debe realizarse un antibiograma preliminar, que permita disponer lo más rápido posible la sensibilidad del microorganismo. Estos resultados tienen un gran valor en el manejo inicial del paciente con bacteriemia. La correlación de este procedimiento con los resultados del antibiograma definitivo realizados a partir de colonias aisladas oscila entre 87 y 99,3% en diversos estudios. En cualquier caso, las discrepancias existentes interesan sólo en la medida en que puedan interferir lesivamente en la adecuada terapéutica del paciente.

Es posible también inocular el caldo de cultivo directamente en sistemas automáticos de identificación y estudio de sensibilidad. Algunos permiten la lectura de los resultados a las tres horas de incubación.

7.2.4. Informe preliminar

El hallazgo de un hemocultivo positivo puede ser crítico por lo que el resultado obtenido de la tinción de Gram debe informarse inmediatamente por vía telefónica al médico responsable del enfermo y dejar registrado el día, la hora y el nombre de la persona que recibe el informe. En dicho informe se especificará la morfología de los microorganismos, el resultado de la tinción de Gram, el número de hemocultivos en los que se observan con referencia al total de los extraídos y la fecha de obtención de los

mismos. Debe informarse, en cuanto se disponga de ella, la sensibilidad del microorganismo a los antimicrobianos según el antibiograma inicial. El informe verbal debe ir seguido de uno escrito informando en los mismos términos y advirtiendo de que será seguido del informe definitivo.

7.2.5. Identificación e informe definitivo

Tras el crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo se identificarán y se realizarán pruebas de sensibilidad por los métodos estándar. Los microorganismos considerados como contaminantes se identificarán sólo al nivel de genero. Obtenida la información definitiva, se emitirá un informe escrito. Se informará también verbalmente en el caso de que los resultados sean discrepantes con los proporcionados previamente.

7.3. INFORME DE LOS HEMOCULTIVOS NEGATIVOS

Los hemocultivos en los que no se aíslan microorganismos, transcurrido el período de incubación establecido, se informarán por escrito como estériles o negativos. Se puede añadir una frase en la que consten los días de incubación, por ejemplo: "Estéril a los 5 días de incubación".

8. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Un hemocultivo puede ser positivo sin que ello represente un episodio verdadero de bacteriemia. Es frecuente que la propia microbiota cutánea del enfermo o del personal que realice la toma del hemocultivo pueda contaminar la sangre en el momento de la extracción. También el laboratorio, durante la manipulación de los hemocultivos, puede inocular de forma accidental los microorganismos. Si la técnica de extracción, transporte y procesamiento es correcta, no debe contaminarse más de un 3% de

todas las extracciones.

Denominamos bacteriemia verdadera a aquella producida por microorganismos realmente presentes en la sangre de los pacientes y falsas bacteriemias a las causadas por una contaminación accidental de los medios de cultivo.

La distinción entre la verdadera bacteriemia y la que no lo es constituye un asunto de la máxima importancia y trascendencia para el paciente. Uno de los datos orientativos más importante lo constituye la propia identidad de los microorganismos aislados. Microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables de bacteriemias verdaderas en más del 90% de los casos. Por el contrario, es dudoso el papel que representan los microorganismos que forman parte de la microbiota del paciente como los estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp. y algunas especies de *Clostridium* que, en conjunto, suponen menos del 5% de las bacteriemias verdaderas. Sin embargo, algunos de estos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias en algunas situaciones y por tanto, su identidad no es un dato suficiente para establecer el criterio de significación clínica. Es preciso recurrir al número de hemocultivos en que se repite el aislado y en este sentido, sin que el dato sea definitivo, es indudable que la repetición de la misma bacteria en más de una extracción (suponiendo que todas las extracciones no se han realizado desde una misma vía contaminada), aumenta la probabilidad de que se trate de una bacteriemia verdadera. Por el contrario, la presencia de un solo hemocultivo positivo de extracciones seriadas en un corto período de tiempo sugiere una contaminación.

El valor de los hemocultivos cuantitativos para predecir la bacteriemia verdadera también ha sido cuestionado, así como los hemocultivos obtenidos secuencialmente. En el caso de la endocarditis la bacteriemia es continua y si un cultivo es positivo todos deberían serlo también. Sin embargo, la mayor parte de las bacteriemias son transitorias y por lo tanto no es de extrañar que sólo en el 70-80% de los casos los hemocultivos sean positivos. En general es de ayuda también para la interpretación la existencia de cuerpos extraños o focos infecciosos de los que se haya aislado el mismo microorganismo que en la sangre.

En la mayoría de las ocasiones, sin embargo, el laboratorio no dispone de elementos suficientes para establecer con seguridad la significación de la bacteriemia. El microbiólogo debe compartir la información que posee con el clínico responsable del paciente para, junto con los datos clínicos de éste, valorar conjuntamente los resultados obtenidos.

9. MICROORGANISMOS Y SITUACIONES ESPECIALES

Si la colaboración entre el clínico y el microbiólogo es siempre necesaria, mucho más ante la sospecha de

una infección cuyo agente etiológico es infrecuente y, además, de difícil aislamiento y crecimiento. La mayoría necesitan medios de cultivos especiales por sus requerimientos nutritivos y su incubación debe ser prolongada debido a su lento crecimiento. En alguno de estos procesos infecciosos el estudio serológico es indispensable para el diagnóstico; en otros es imprescindible aplicar técnicas de biología molecular que proporcionan información con más celeridad que el cultivo. Estos microorganismos, a veces responsables de las llamadas endocarditis con hemocultivo negativo, incluyen *Brucella*, *Haemophilus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Bartonella*, *Abiotrophia*, etc.

9.1. BRUCELOSIS

Aunque ha disminuído, en España la brucelosis es todavía una enfermedad que se debe tener presente. Para el aislamiento de *Brucella* se ha utilizado clásicamente el medio de cultivo de Castañeda o cualquier frasco de hemocultivo con medio bifásico. La ventaja es que permiten sembrar el medio líquido sobre la fase sólida sin necesidad de abrir o pinchar el frasco. La lectura se realiza diariamente y la bacteria se detecta generalmente entre 4 y 7 días. Las colonias tienen un aspecto característico, translúcidas y agrupadas de forma arrosariada, también llamada de cielo estrellado. Actualmente, con los sistemas automáticos el microorganismo se detecta en los frascos aerobios más rápidamente. Es recomendable, sin embargo, prolongar el período de incubación hasta 21 días, realizar un subcultivo en agar sangre y/o agar chocolate, independientemente de la técnica utilizada, e incubar la placa 3 ó 4 días antes de descartar el hemocultivo como negativo. Debido al riesgo que representa para el personal del laboratorio, se exige un nivel 2 de seguridad para procesar muestras sospechosas de contener *Brucella* y un nivel de seguridad 3 para manipular los cultivos de este microorganismo.

9.2. TULAREMIA

La tularemia es una infección poco frecuente y el aislamiento de *Francisella tularensis*, su agente causal, en un hemocultivo es extremadamente raro ya que la bacteria sólo está en la sangre en la fase aguda de la enfermedad. Los frascos deben incubarse 14 días subcultivándolos, cada 4 días y al final del período de incubación, en agar sangre suplementada con glucosa y cisteína. También se pueden utilizar agar chocolate enriquecido con IsoVitalax o agar charcoal con extracto de levadura. Los niveles de seguridad requeridos son los mismos que los descritos para *Brucella*. Habitualmente, el diagnóstico de tularemia se realiza a través del estudio serológico.

9.3. LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una infección aguda producida por espiroquetas del género *Leptospira* que se presenta con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. El microorganismo suele estar presente en la sangre en la fase aguda, la primera semana de la enfermedad.

El cultivo se realiza añadiendo de 1 a 3 gotas de sangre fresca del paciente a 5 ml de medio de Stuart o

a los medios semisólidos de Fletcher o Ellinghausen. Previamente a la inoculación de la sangre se añade suero fresco de conejo a una concentración del 14%. La incubación se lleva a cabo en ausencia de luz a 30°C durante 28 días. Se realiza el examen microscópico de una parte del cultivo en campo oscuro una vez a la semana con el fin de observar las formas espiroquetales, así como su movilidad. El examen directo de la sangre en campo oscuro no es recomendable ya que es fácil confundir *Leptospira* con restos de hematíes. La técnica descrita no es sencilla, por lo que se aconseja determinar la presencia de anticuerpos específicos siempre que se sospeche este proceso infeccioso.

9.4. BARTONELOSIS

Barton, en 1909, describió el género *Bartonella* como bacterias de crecimiento intraeritrocítico. Son bacilos gramnegativos muy pequeños, ligeramente curvados y de difícil aislamiento. *B. henselae* y *B. quintana* se han descrito como agentes responsables de endocarditis infecciosa en vagabundos, enfermedad granulomatosa, peliosis, enfermedad por arañazo de gato... También se han asociado a síndromes neurológicos en pacientes portadores del VIH. Existen zonas endémicas que constituyen una amenaza para los viajeros.

Se ha obtenido crecimiento de *Bartonella* en líneas de cultivo celular HeLa, células endoteliales y/o en cultivo primario de monocitos humanos. Aunque no es fácil, el mejor sistema para aislar *Bartonella* es la técnica de lisis-centrifugación: el subcultivo debe hacerse en medio fresco de agar sangre o chocolate, sellar las placas pasadas las primeras 24 h e incubar a 35-37°C en 5-10% de CO₂ con 40% de humedad durante 30-40 días. *Bartonella* no enturbia los medios líquidos y los sistemas automáticos no detectan la producción de CO₂ por lo que hay que realizar subcultivos ciegos a partir del séptimo día. Algunos autores recomiendan combinar el subcultivo con la tinción de naranja de acridina o de Jiménez. El estudio de PCR a partir de muestras clínicas, así como el estudio serológico, es muy útil para el diagnóstico.

9.5. BACTERIAS DEFICIENTES EN PARED

Las llamadas formas L o bacterias deficitarias en pared raramente se aíslan de hemocultivos. Para conseguirlo hay que estabilizar osmóticamente el medio con sacarosa o manitol al 10% en el laboratorio, lo que provoca un importante riesgo de contaminación, o bien emplear medios específicos comerciales. A veces, en pacientes tratados con antibióticos betalactámicos, se observan en la tinción de Gram formas bacilares gramnegativas alargadas por alteración de la pared que se recuperan en el subcultivo.

9.6. ABIOTROPHIA

Eran conocidas con anterioridad como bacterias con requerimientos nutricionales especiales. Crecen bien en los frascos de hemocultivo ya que contienen sangre fresca del paciente. 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 chocolate, siendo necesario realizar el subcultivo en placas de agar sangre enriquecida con vitamina B 6 (en forma de piridoxal, no como piridoxina ni piridoxamina) o con cisteína. Una forma sencilla de demostrar su deficiencia nutricional es realizando una estría de *S. aureus* hemolítico en una placa de agar sangre. A las 24-48 h se puede observar el crecimiento de microcolonias haciendo satelitismo alrededor de la estría de estafilococo. Estas bacterias suelen desarrollarse también en las placas empleadas para el crecimiento de anaerobios, las cuales suelen contener cisteína. Para no confundirlas con *Peptostreptococcus* es útil hacer un subcultivo en dos placas enriquecidas de anaerobios e incubar una en CO₂ y otra en atmósfera anaerobia.

9.7. BACTERIAS DEPENDIENTES DE ANTIBIÓTICOS

El uso prolongado de antimicrobianos de amplio espectro es uno de los factores que ha contribuido a la aparición de enterococos resistentes a la vancomicina (EVR). En los últimos años se han descrito casos de pacientes sometidos a tratamiento con vancomicina en los que se han aislado enterococos dependientes de vancomicina (EVD), mutantes de EVR que sólo crecen en presencia de glicopéptidos y que pierden esta dependencia en los subcultivos sucesivos. Se ha detectado un brote de infección nosocomial causada por EVD en pacientes trasplantados de médula ósea sometidos a profilaxis con vancomicina. Su significado clínico aún no ha sido aclarado.

Se puede sospechar la presencia de estos microorganismos en pacientes con múltiples tratamientos antimicrobianos y de larga duración, especialmente si en el entorno existen EVR y si se observan en la tinción de Gram formas semejantes a las descritas como *Abiotrophia*.

9.8. MICOPLASMAS

Aunque no es frecuente, se han aislado *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en hemocultivos de mujeres con fiebre postparto o postaborto o cirugía ginecológica. Suelen ser bacteriemias transitorias autolimitadas que evolucionan bien, incluso sin tratamiento específico. Se han descrito también bacteriemias por *M. hominis* en quemados, leucémicos, politraumatizados, trasplantados renales, etc. Los sistemas automáticos permiten el crecimiento de estos microorganismos aunque el SPS los inhibe y raramente serán detectados, por lo que es conveniente realizar un subcultivo en medios específicos para micoplasmas genitales al finalizar el período de incubación.

Crecen bien en el medio Plus Anaerobio/F de Bactec 9240, aunque el sistema no los detecta. En mujeres con infección pélvica o postparto y sospecha de bacteriemia con hemocultivos negativos es aconsejable realizar un subcultivo en medios específicos a los 7 días. En el agar sangre incubado 72 ó 96 horas en 5-10% de CO₂ se puede advertir la presencia de microcolonias y no observar

microorganismos en la tinción de Gram. Este hecho debe hacer sospechar la posibilidad de la presencia de micoplasma. También se puede realizar una tinción de Dienes de las microcolonias.

9.9. MICOBACTERIAS

La sangre no era la muestra más adecuada para diagnosticar una micobacteriosis y constituía un hecho anecdótico el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias a partir de la misma. Sin embargo, la aparición del VIH puso de relieve la existencia de nuevas formas de enfermedad tuberculosa y paralelamente la presencia de micobacterias en sangre se hizo cada vez más frecuente, por lo que está indicada su investigación. El primer sistema utilizado para este fin fue el Bactec 460 radiométrico, sustituido en la actualidad por los sistemas de monitorización continua que utilizan frascos específicos para micobacterias. Aun no siendo los medios apropiados, la incubación prolongada hasta 6 semanas de los frascos aerobios de los diferentes sistemas permite también detectar la presencia de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. Otro método muy útil es el de lisis-centrifugación. Puede ser eficaz realizar una combinación de dos métodos: en primer lugar procesar la sangre por la técnica de lisis-centrifugación y sembrar el sedimento después en un frasco de los sistemas automáticos con el fin de acortar el período de incubación.

Actualmente, con el tratamiento antiretroviral, han disminuido las infecciones oportunistas en los pacientes con sida, por lo que también ha descendido el número de micobacteriemias en estos pacientes.

9.10. LEISHMANIASIS

En los países mediterráneos es frecuente la leishmaniasis, parasitosis del sistema mononuclear fagocítico causada por *Leishmania donovani*. Es otra de las infecciones que se incrementaron con la aparición del SIDA y que ha vuelto a disminuir con los actuales tratamientos antivirales. El diagnóstico requiere la visualización de *Leishmania* en una tinción de Giemsa a partir de muestras obtenidas de médula ósea, biopsia de bazo o adenopatía, o bien el cultivo de la misma.

El medio clásico utilizado es el NNN, al cual hay que añadir una tercera parte de su volumen de sangre defibrinada de conejo. Es algo laborioso de preparar y fácil la contaminación del mismo. Otros medios útiles son el medio *Drosophila* de Schneider, al que se añade suero fetal bovino a una concentración del 30%, y el medio MEM (Eagle minimal essential medium) al que también se le adiciona suero fetal bovino. Se inoculan dos o tres gotas de la muestra por tubo de medio preparado y se dejan a temperatura ambiente durante 1 mes. Se realiza un examen microscópico del medio de cultivo a 400 aumentos, colocando una gota entre porta y cubreobjetos el tercer día de incubación y después una vez a la semana.

9.11. HONGOS

Clásicamente se ha recomendado el medio bifásico o Castañeda para la recuperación de hongos. En los

últimos 20 años los múltiples avances en las técnicas de hemocultivo, entre ellos, la mejor calidad de los medios empleados, tanto en la técnica convencional como en los sistemas automáticos, la ventilación de los frascos aerobios, el desarrollo de medios de cultivo con resinas, así como los de alto volumen, y la agitación continua de los frascos, han permitido diagnosticar un mayor número de fungemias. Un método muy útil es el de lisis-centrifugación, que ha demostrado una gran efectividad para recuperar hongos, especialmente *Histoplasma capsulatum*, ya que permite seleccionar los medios de subcultivo.

Las levaduras son responsables de la mayoría de las fungemias, siendo el género *Candida* el más frecuente. En ocasiones y dependiendo del medio de cultivo empleado debe ventilarse el frasco aerobio. Los hongos levaduriformes se aíslan en los frascos aerobios de hemocultivo con relativa rapidez, no después de 5-7 días de incubación. No obstante, si se sospecha que el agente causal es un hongo dimórfico o filamentoso es recomendable prolongar su incubación hasta 30 días a 22-30°C con un subcultivo final antes de descartar como negativo. Para recuperar *Malassezia furfur* el medio debe ser suplementado con sustancias que aporten ácidos grasos de cadena larga como el aceite de oliva.

Los pacientes con mayor riesgo de fungemia son los inmunodeprimidos, especialmente hematológicos y trasplantados. En los portadores del VIH debe sospecharse la posibilidad de que el causante de la fungemia sea *Cryptococcus neoformans*.

9.12. VIRUS

El hemocultivo para detectar virus se realiza habitualmente en pacientes trasplantados de órgano sólido o de médula ósea para el control de citomegalovirus (CMV). A partir de monocitos y polimorfonucleares del paciente se inoculan frascos de hemocultivo convencionales y los denominados "shell vials". La alternativa al cultivo es la detección directa de CMV (antigenemia) en leucocitos, no aconsejable en neutropénicos, y la detección del ADN de CMV por PCR en leucocitos o plasma. Se realizan también hemocultivos para detectar viremias causadas por Herpes simplex, VIH y virus de la hepatitis C y con menor frecuencia para otros virus. No está bien definido el volumen de sangre por hemocultivo ni el número de los mismos. En general se extraen entre 2 y 5 ml de sangre con EDTA que se transportan de inmediato al laboratorio de Microbiología (ver procedimientos específicos de virología).

9.13. ENDOCARDITIS

Cuando se sospecha una endocarditis infecciosa es aconsejable realizar tres hemocultivos con un volumen de sangre por extracción no inferior a 10 ml. Su finalidad es detectar la bacteriemia continua y descartar agentes etiológicos contaminantes como estafilococo coagulasa negativa o corinebacterias, que al mismo tiempo suelen ser los microorganismos responsables de la endocarditis protésica. Aunque todos los microorganismos pueden causar endocarditis infecciosa, los más habituales (estreptococos,

estafilococos) suelen crecer en las primeras 48 horas. Pasado este tiempo, si el paciente no ha recibido tratamiento antimicrobiano se sospechará la, mal llamada en algunos casos, endocarditis con hemocultivo negativo, como la causada por microorganismos del grupo HACEK, *Brucella*, *Abiotrophia*... Los frascos deberán incubarse entre 2 y 4 semanas, subcultivando en medios específicos al final de la incubación. En pacientes con hemocultivo negativo debe realizarse al mismo tiempo un estudio serológico frente a *Coxiella burnetii*, *Legionella*, *Brucella*, *Bartonella* y *Chlamydia*, particularmente si han recibido tratamiento antimicrobiano previo. En este caso, si el paciente mantiene un buen estado hemodinámico, lo indicado es interrumpir el tratamiento antimicrobiano y repetir los hemocultivos como mínimo 48 h después de la suspensión.

9.14. BACTERIEMIA ASOCIADA A CATÉTER

El 100% de los pacientes ingresados en áreas de vigilancia intensiva son portadores de catéteres intravasculares (CIV) y la mayoría de ellos están pluricaterizados. No sólo son portadores de CIV los pacientes ingresados, sino también pacientes en régimen ambulatorio sometidos a hemodiálisis o quimioterapia. Los datos clínicos son poco útiles para el diagnóstico de la bacteriemia asociada a catéter por su baja sensibilidad y especificidad, por lo que se requiere la confirmación microbiológica para tener un diagnóstico de certeza.

En breve va a ser publicado un procedimiento específico titulado "Infección asociada a catéter", que el lector interesado en el tema puede revisar. No obstante, a continuación se resumen las técnicas microbiológicas empleadas para el diagnóstico de las bacteriemias asociadas a catéter.

Procedimientos diagnósticos sobre catéteres retirados

Cultivo cualitativo de la punta del catéter. Esta técnica consiste en cortar asépticamente el extremo distal del catéter e introducirlo en un tubo con medio líquido. Es sencilla y sensible, aunque no permite cuantificar el número de UFC, por lo que no se recomienda en la actualidad.

Cultivo semicuantitativo de la punta del catéter. Descrita por Makí, se cultiva la superficie externa de la punta del catéter. Para ello se rueda la punta distal del CIV en una placa de agar sangre con la ayuda de pinzas estériles. Es la técnica de referencia.

Cultivo cuantitativo de la punta del catéter. Técnicas más complejas descritas por Cleri, Brun-Buisson, Sheretz y Liñares.

Procedimientos diagnósticos manteniendo el catéter. Más del 70% de los catéteres retirados por sospecha de infección son estériles, por lo que son necesarios procedimientos diagnósticos que no obliguen a disponer del catéter. Los cultivos de la piel en el punto de inserción y de la conexión, el cepillado endoluminal del catéter y los métodos que comparan los resultados obtenidos de los hemocultivos de sangre extraída de una vena periférica y los realizados a través del catéter son los procedimientos más utilizados. En cuanto a estos últimos, concretamente, se ha propuesto

comparar el tiempo de crecimiento de los hemocultivos extraídos de una vena periférica y de los extraídos a través del catéter.

10. CONTROL DE CALIDAD

10.1. MANUALES Y NORMAS

El laboratorio de Microbiología debe poseer, debidamente actualizado, un manual de procedimientos o guía en la que se describa exhaustivamente la metodología de los hemocultivos. Además, deberá dictar normas específicas para el personal sanitario en relación con la asepsia de la piel, la venopunción y la inoculación de los frascos de hemocultivo, así como recomendaciones sobre el número e intervalo de extracción de los hemocultivos, el volumen de sangre para cultivar y la selección del tipo de frasco o medio de cultivo.

10.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Periódicamente, y al menos una vez al año, deberán evaluarse los resultados obtenidos del procesamiento de los hemocultivos. El análisis de estos datos proporciona una valiosa información sobre el control de calidad interno del laboratorio. Se evaluará la tasa de positividad, la de falsos positivos y la cifra total y el tipo de microorganismos aislados.

La tasa de contaminación, si los hemocultivos son obtenidos y procesados correctamente, no debe superar el 3% del total de hemocultivos. Si es mayor deberán establecerse medidas como informar periódicamente al personal sanitario de la importancia de una técnica aséptica de extracción de la sangre, utilizar la misma aguja para la extracción de la sangre y la inoculación del frasco, y controlar y cambiar, si es necesario, los antisépticos empleados. Una tasa de positividad muy baja puede reflejar una excesiva utilización de los hemocultivos.

El número de bacteriemias, así como su origen, comunitario o intrahospitalario, y su localización por servicios proporciona datos esenciales para el conocimiento, vigilancia y control de la infección.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouza E, Loza E, Planes, A, Rodríguez Cobacho A. Procedimientos en Microbiología Clínica, Hemocultivos. 1993. Coordinador, J Romero Vivas, Ed JJ Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
2. Bouza E, Burillo A, Muñoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 265-274.
3. Brouqui P; Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 177-207.
4. Capdevila JA, Planes AM, Palomar M, Gasser I, Almirante B, Pahissa A, Crespo E, Martínez-Vázquez JM. Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter related sepsis. Eur J Clin Infect Dis 1999; 29: 403-407.
5. Creixems MR, Fron C, Muñoz P, Sánchez C, Peláez T, Bouza E. Use of anaerobically incubated media to increase yield of positive blood cultures in children. Pediatr Infect Dis J 2002; 21: 443-446.
6. Dune WM Jr, Nolte FS, Wilson ML. Cumitech 1B, Blood cultures III. 1997. Coordinating ed, JA Hindler. American Society for Microbiology, Washington DC.

7. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-465.
8. Richter SS, Beekmann SE, Croco JL, Diekema DJ, Koontz FP, Pfaller MA, Doern GV. Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2437-2444.
9. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 584-602.
10. Wilson ML, Weinstein MP. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Clin Lab Med* 1994; 14: 69-82.

DOCUMENTO TÉCNICO

HEMOCULTIVOS
PNT-HC-01

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°ASIGNADA A.....

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

Servicio de Microbiología	Hemocultivos	Fecha: PNT-HC-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar la realización de los hemocultivos. Su aplicación se extiende desde la extracción de los mismos por el equipo de enfermería que atiende al paciente, cuyo procedimiento debe vigilar y dirigir el responsable del laboratorio de Hemocultivos, hasta la emisión de los resultados.

2. FUNDAMENTO

El procesamiento de los hemocultivos constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología Clínica. Las siguientes normas e instrucciones no se conciben como el "estándar de oro" de un laboratorio de hemocultivos, sino que pretenden ser un fiel reflejo del procesamiento de los hemocultivos.

Indicaciones

- Pacientes con fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ o cuya temperatura sea inferior a 36°C .
- Pacientes con leucocitosis o leucopenia.
- Pacientes con trombopenia o alteraciones de la coagulación de causa no filiada.
- Pacientes con infección focal de etiología no aclarada.
- Pacientes con deterioro uni o multiorgánico, shock o inestabilidad hemodinámica.
- Neonatos ante la mínima sospecha de infección.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Normas o libro de hemocultivos.

Manuales de instrucciones de las técnicas aplicadas.

Normas NCCLS de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos.

Normas de bioseguridad.

4. TOMA DE LA MUESTRA

4.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

En una bandeja se preparará:

- 1.- Un compresor elástico.
- 2.- Un paquete de gasas estériles.
- 3.- Un frasco preferiblemente con solución yodada o povidona yodada y una gasa impregnada en alcohol de 70° .
- 4.- Una jeringuilla desechable de 10 ml de capacidad con su correspondiente aguja I.V.
- 5.- Un juego de dos frascos de hemocultivo (aerobio y anerobio) por cada extracción

4.2. OBTENCIÓN DE LA SANGRE

Momento y lugar de la extracción.- Se extraerán 2-3 hemocultivos con el menor intervalo de tiempo posible después de la aparición de los síntomas utilizando lugares de venopunción diferentes. Cada hemocultivo o extracción consta de dos frascos con tapones de diferente color.

Método de la extracción:

- 1- Levantar la lengüeta plástica de los frascos y limpiar los tapones con una gasa impregnada en solución yodada o povidona yodada.
- 2- Colocar el compresor al paciente tras elegir la vena a pinchar. Tras ello se limpia con una gasa

impregnada en alcohol de 70° una zona de la piel de un diámetro de 3-5 cm en el lugar elegido para la palpación y los dedos del explorador. Dejar actuar al menos 1 minuto.

3- Pintar ampliamente con povidona la piel de la zona a pinchar (al menos en un diámetro de 10 cm). A continuación se pintarán las yemas de los dedos índice, medio y pulgar de la mano utilizada para la palpación de la vena. El efecto de la povidona no se ejerce de modo total hasta que transcurre el tiempo suficiente para su oxidación (secado).

4- Extraer un mínimo de 10 ml de sangre (5 ml por frasco) en los adultos y la mayor cantidad posible en los niños, a ser posible una cantidad mínima de 2 ml (1 ml por frasco).

5- Introducir 5 ml de sangre en cada uno de los dos frascos correspondientes a esa extracción (aerobio y anaerobio), evitando la entrada de aire, pinchando a través del tapón de goma. 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 rápidamente más cantidad de sangre que la adecuada 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 que cualquier tubo para otros fines, ya que se puede contaminar la aguja del sistema Vacutainer y por consiguiente los hemocultivos extraídos con posterioridad.

6- Se rotulará cada frasco con una etiqueta adhesiva en la que figuren el n° de historia, nombre del enfermo y el número de extracción realizada (1°, 2ª ó 3ª), teniendo la precaución de no tapar la etiqueta de código de barras del frasco.

4.3. ENVÍO DE LOS HEMOCULTIVOS AL LABORATORIO

1- Se rellenará un volante para cada extracción (dos frascos). Es absolutamente necesario indicar en los volantes el nombre del paciente, el servicio donde se encuentra ingresado, el número de cama y el número de teléfono del control de enfermería con objeto de informar los resultados preliminares en caso de positividad. Si los hemocultivos son extraídos en el Servicio de Urgencias y el paciente es dado de alta, se anotará en los volantes el número de teléfono del domicilio del paciente o donde pueda ser localizado en caso de positividad.

Sería deseable añadir en los volantes otra información que ayudara a la valoración de la bacteriemia en el laboratorio como si está recibiendo tratamiento antibiótico, la enfermedad de base del paciente, el síndrome clínico que padece en el momento actual y si la infección es de adquisición nosocomial o comunitaria.

2.- Los 4-6 frascos de cada paciente con los 2-3 volantes se introducirán en una bolsa de plástico y se enviarán inmediatamente al Servicio de Microbiología,

Servicio de Microbiología	Hemocultivos	Fecha: PNT-HC-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 5

donde se introducirán en una estufa a 35-37°C. Nunca deben dejarse en nevera.

4.4. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LOS HEMOCULTIVOS

Los técnicos del laboratorio sacarán de la estufa los hemocultivos llegados durante la noche y procederán de la siguiente forma:

1- Sacar los 4-6 frascos y los volantes de la bolsa de plástico y colocarlos por parejas en el orden de extracción (1ª, 2ª y 3ª).

2- Comprobar que cada pareja de frascos llega acompañada de su volante correspondiente y que coinciden los datos que figuran en los volantes y en los frascos.

3- Asignar a cada extracción, bien sea de dos o un solo frasco, un número correlativo del registro general. Dicho número se anotará en el volante y en el frasco o frascos de cada extracción.

4- Si la petición es de cultivo para micobacterias, existe un frasco especial para tal fin. Sólo es necesario un frasco y por tanto una sola extracción.

5- Colocar todas las parejas de frascos por orden numérico y llevarlos al laboratorio de hemocultivos. Los volantes pasarán a Secretaría para su registro en el sistema de gestión del laboratorio.

6- Aunque existan graves deficiencias en el envío de la muestra, dada la importancia del diagnóstico de bacteriemia, nunca será rechazada. Sin embargo, constará en la información de los volantes: "Interpretar resultados con precaución...", anotándose el tipo de deficiencia encontrado.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO:

Frascos de hemocultivos. Cada control de enfermería del hospital solicitará los frascos al Almacén General. Deben almacenarse a temperatura ambiente. El tipo de frascos que deben utilizarse y la empresa que los suministra será decisión del Servicio de Microbiología.

Medios de cultivo para subcultivos e identificación:

- Agar sangre (Nevera a 4°C)
- Agar chocolate (Nevera a 4°C)
- Agar *Brucella* (Nevera a 4°C)
- Agar Mueller Hinton (Nevera a 4°C)
- Agar MacConkey (Nevera a 4°C)
- Agar CNA (Nevera a 4°C)
- Medios específicos para hongos (Nevera a 4°C)
- Medios específicos para anaerobios (Nevera a 4°C)
- Otros medios (Nevera a 4°C)

5.2. REACTIVOS:

Tubos de agua destilada estéril (Temperatura ambiente)

Sistemas de identificación:

- Discos de optoquina (Nevera a 4°C)
- Discos de bacitracina (Nevera a 4°C)
- Discos de novobiocina
- TSI
- Coagulasa
- DNasa
- Bilis-esculina

- Tubos para pruebas bioquímicas
- Tiras para la determinación de oxidasa (Nevera a 4°C)
- Equipo de determinación grupos antigénicos *Streptococcus* (Nevera a 4°C)
- Equipo de identificación por aglutinación de *S. aureus* (Nevera a 4°C)
- Indicadores de anaerobiosis (resazurina)
- Antisueños *Brucella* (*B. abortus* y *B. melitensis*) (Nevera a 4°C)
- Antisueños *Listeria* (Nevera a 4°C)
- Aceite de inmersión (Temperatura ambiente)
- Otros

Reactivos para tinciones (Temperatura ambiente)

Discos de antibióticos para determinación de sensibilidad (Nevera 4°C)

5.3. OTROS

6. APARATOS Y MATERIAL

Descripción del **sistema de hemocultivos** utilizado por el laboratorio.

Otro aparataje:

- Neveras (control diario de temperatura).
- Estufa de cultivo a 35°C (control diario de temperatura).
- Cabina de seguridad biológica (limpieza diaria después de su utilización).
- Microscopio óptico (limpieza después de su utilización).
- Microscopio de fluorescencia.
- Otros.

Otro material necesario:

- Asas desechables
- Aguja y jeringas para subcultivos
- Torundas
- Portas
- Cubres
- Tubos pequeños estériles
- Guantes
- Papel de filtro
- Clorogel y lejía
- Papel de manos
- Otros

Al finalizar cada jornada de trabajo se revisarán y repondrán los productos y material necesario para el trabajo del día siguiente. Semanalmente, por escrito, se solicitará al supervisor el material fungible que precise ser repuesto.

7. PROCESAMIENTO

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

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

7.3. PROCESAMIENTO DE LOS FRASCOS POSITIVOS

Servicio de Microbiología	Hemocultivos	Fecha: PNT-HC-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 5

En la cabina de seguridad biológica, donde se encuentran todos los frascos que el sistema ha detectado como sospechosos de crecimiento colocados por orden numérico, se introduce en cada uno de los tapones de goma de los frascos una aguja con su jeringa. Tras invertir los frascos con una ligera agitación, se extraen de los mismos 2 ml de caldo que se introducen en un tubo estéril rotulado con el número del frasco. A continuación se realizará:

1.- Tinción de Gram

a - Colocar en el interior de la cabina portaobjetos rotulados con el número de registro de cada frasco y una "V" si se trata de un frasco aerobio o una "N" si es uno anaerobio.

b - Colocar sobre el correspondiente porta 1 ó 2 gotas del contenido del tubo, comprobando la coincidencia del número del tubo y del rotulado en el porta.

c - Extender la gota ligeramente con el asa.

d - Realizar la tinción de Gram.

e - Observar al microscopio la presencia de microorganismos. El resultado de la tinción se anotará en la hoja de trabajo por orden numérico. Si se observa la presencia de levaduras se realizará una tinción de tinta china con el objeto de descartar de forma precoz *Cryptococcus neoformans*.

2.- Subcultivos

A todos los frascos sospechosos de crecimiento se les realizarán subcultivos en agar sangre, agar chocolate con IsoVitalax y agar *Brucella*.

Si en la tinción de Gram se observan simultáneamente microorganismos grampositivos y gramnegativos se realizará, además, un subcultivo adicional en placas de agar CNA (colistina + ácido nalidíxico) y agar MacConkey. Si en la tinción de Gram se observan levaduras se hará un subcultivo adicional en medios para hongos.

Las placas de agar sangre, las de MacConkey y las de hongos se colocarán por orden numérico y se incubarán a 35°C en atmósfera aerobia. Las placas de agar chocolate, CNA y anaerobias, también en orden numérico, se colocarán en campanas de CO₂ y anaerobiosis, respectivamente, y se incubarán a 35°C.

3.- Identificación y antibiograma preliminares

Dependiendo del resultado de la tinción de Gram se realizarán pruebas específicas de identificación y antibiograma preliminares utilizando como inóculo unas gotas del caldo de cultivo de los frascos de hemocultivo siguiendo el siguiente esquema:

a) Cocos grampositivos en racimos: TSI, DNAsa o coagulasa, novobiocina, antibiograma en agar Mueller Hinton con discos de antibióticos para grampositivos.

b) Cocos grampositivos en cadenas o diplococos: bilis-esculina y antibiograma en agar sangre con discos para grampositivos, añadiendo un disco de optoquina y otro de bacitracina.

c) Cocos gramnegativos: antibiograma en agar chocolate con discos para *Neisseria* e incubación en CO₂.

d) Bacilos gramnegativos: pruebas bioquímicas de identificación y antibiograma en agar Mueller Hinton con discos para gramnegativos.

e) Cocobacilos gramnegativos: antibiograma en agar chocolate incubado en CO₂ (*Haemophilus*) con discos para gramnegativos.

e) Bacilos grampositivos: esculina, antibiograma agar sangre con discos para grampositivos.

f) Flora mixta: Se esperará al crecimiento del subcultivo al día siguiente.

Otra alternativa es la inoculación del caldo de cultivo directamente en sistemas automáticos de identificación y estudio de la CMI, algunos de los cuales, además, permiten la lectura de los resultados en tres horas.

El antibiograma preliminar se realizará a todos los frascos de hemocultivo siguiendo el esquema indicado, con independencia de que se trate de hemocultivos del mismo paciente y de que la tinción de Gram muestre el mismo tipo de microorganismos.

7.4. LECTURA DE PLACAS E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Las placas de agar sangre de los subcultivos, así como los antibiogramas, se leerán tras 18-24 h de incubación, mientras que las de agar chocolate y las placas de anaerobios se leerán a las 48 h, siguiendo el siguiente esquema:

1.- Colocar las placas de agar sangre de los hemocultivos de sospecha del día anterior en orden numérico junto con las pruebas y los antibiogramas correspondientes y proceder a su lectura.

2.- Colocar las placas de agar chocolate y anaerobios de los hemocultivos de sospecha de dos días anteriores (48 horas de incubación) en orden numérico.

3.- Preparar los "protocolos de trabajo" donde se habrán anotado los resultados de la tinción de Gram de los frascos positivos, que estarán en una carpeta en orden numérico, y anotar los resultados de las pruebas y de los antibiogramas.

4.- Preparar las "hojas de trabajo" donde se anotarán todas las pruebas que deben ser realizadas de cada placa.

7.5. PROCESAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS SIGNIFICATIVOS

Los microorganismos aislados que se consideren productores de bacteriemia significativa se identificarán de forma definitiva y se les realizarán, en caso necesario, las pruebas de sensibilidad correspondientes.

Los microorganismos anaerobios y los hongos pasarán a los laboratorios específicos para su identificación. Todos irán acompañados de un protocolo de trabajo con toda la información necesaria.

Todos los microorganismos significativos se conservarán en el archivo de cepas.

7.6. PROCESAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

Los microorganismos considerados contaminantes se identifican sólo a nivel de género. En general se consideran contaminantes los siguientes microorganismos, siempre que crezcan en un solo hemocultivo o extracción:

Servicio de Microbiología	Hemocultivos	Fecha: PNT-HC-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 5

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

Para considerar que alguno de los microorganismos descritos anteriormente, causan bacteriemia significativa deben estar presentes con idéntico biotipo y antibiotipo (en su caso) en 2 o más hemocultivos o extracciones del mismo paciente.

7.7. PROCESAMIENTO DE LOS FRASCOS NEGATIVOS

Transcurrido el tiempo de incubación preestablecido, los frascos donde no se ha detectado crecimiento serán desechados.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. INFORME PRELIMINAR DE LOS HEMOCULTIVOS SOSPECHOSOS DE CRECIMIENTO

A última hora de la mañana se informará, de forma preliminar mediante llamada telefónica a los controles de enfermería, de los resultados de la tinción de Gram de los hemocultivos sospechosos en los siguientes casos:

Pacientes con 2 o más extracciones con cocos grampositivos en racimos

Pacientes con 1 o más extracciones con cocos grampositivos en cadenas o diplococos

Pacientes con 1 o más extracciones con bacilos gramnegativos

Pacientes con 1 o más extracciones con flora mixta

Pacientes con 1 o más extracciones con cocos gramnegativos en diplos.

Pacientes con 1 o más extracciones con levaduras

Los datos de todos los frascos sospechosos de crecimiento (número de registro, nombre del paciente, servicio y cama, fecha de la extracción, tipo de muestra, número de hemocultivos positivos/número de hemocultivos extraídos y resultado de la tinción de Gram) serán diariamente registrados. Cuando el paciente haya sido avisado telefónicamente se colocará un asterisco junto al nombre del paciente y el nombre de la persona a la que se ha comunicado la información.

Asimismo, se informarán los resultados del antibiograma preliminar al médico responsable del paciente que lo solicite.

8.2. INFORME DE RESULTADOS POSITIVOS DEFINITIVOS

Una vez terminado el procesamiento de los hemocultivos, se registrarán los resultados en el programa de gestión del laboratorio y se imprimirá el informe definitivo. Una vez impresos todos los informes positivos, el facultativo encargado los revisará y firmará. Los informes de las extracciones del mismo paciente y de la misma tanda de hemocultivos se envían juntos, grapados.

A los microorganismos considerados contaminantes no se les informa el antibiograma, aunque su sensibilidad quedará registrada por si se requiere con posterioridad.

Después de enviar la información hacia las áreas de hospitalización correspondientes, todos los resultados se anotarán en el Libro de Registro de Hemocultivos y en la hoja diaria y se desecharán los frascos crecidos que ya han sido informados. Todos los protocolos de trabajo de los hemocultivos significativos se guardarán en archivadores, ordenados por orden alfabético.

8.3. INFORME DE RESULTADOS NEGATIVOS

Los hemocultivos negativos permanecerán en incubación durante 5 o 21 días según su caso y transcurrido ese tiempo se informarán como estériles o negativos.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de la técnica, de realizar el informe preliminar verbal de los hemocultivos con sospecha de crecimiento y de emitir el informe escrito preliminar y el definitivo siempre bajo la supervisión del facultativo responsable.

El facultativo de hemocultivos también tendrá bajo su responsabilidad la interpretación de los resultados y la validación de todos los informes emitidos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los sistemas automáticos de monitorización continua de hemocultivos permiten determinar el momento en el que se produce el crecimiento de la mayor parte de las bacterias y los hongos de relevancia clínica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Estos sistemas automáticos no permiten detectar el crecimiento de algunas bacterias como *Francisella* spp., *Leptospira* spp., *Bartonella* spp. y *Mycoplasma* spp., parásitos ni virus.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Bouza E, Loza E, Planes, A, Rodríguez Cobacho A. Procedimientos en Microbiología Clínica, Hemocultivos. 1993. Coordinador, J Romero Vivas, Ed J Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
- 2.- Dune WM Jr, Nolte FS, Wilson ML. Cumitech 1B, Blood cultures III. 1997. Coordinating ed, JA Hindler. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 3.- Loza E, Alomar P, Bernal A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá ML. Procedimientos en Microbiología Clínica, Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica. 2000. Coordinadora, E Loza, Ed JJ Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
- 4.- Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 444-465.
- 5.- Wilson ML, Weinstein MP. General principles in the laboratory detection of bacteremia and fungemia. Clin Lab Med 1994; 14: 69-82.