

Contenido de frascos y métodos para realizar hemocultivos

Bottle content and methods for blood cultures

Elio Jesús Núñez Tamayo

RESUMEN

El hemocultivo es el único examen utilizado hasta el momento para el diagnóstico de septicemia. Los medios utilizados en los hemocultivos son polivalentes y enriquecidos nutricionalmente. Se emplean distintos caldos nutritivos, pero todos han demostrado que no existe un medio de cultivo que pueda considerarse superior a todos los demás. Existen métodos manuales y automatizados, pero independientemente del método de identificación usado, este siempre debe acompañarse de la realización de un antibiograma directamente o no de la sangre del hemocultivo positivo.

Palabras clave: Hemocultivo, septicemia, diagnóstico, bacteriemia, fungemia.

SUMMARY

Blood culture is the only test used to date for the diagnosis of sepsis. The media used in blood cultures are polyvalent and nutritionally enriched. Different nutrient broths are used, but all have shown that no culture medium can be considered superior to all others. There are manual and automated methods, but regardless of the identification method used, it should always be accompanied by performing an antibiogram, directly or not, of the blood from the positive blood culture.

Keywords: Blood culture, septicemia, diagnosis, bacteriemia, fungemia.

INTRODUCCIÓN

Los medios utilizados en los hemocultivos son polivalentes y enriquecidos nutricionalmente. Las variaciones en la composición de un mismo tipo de medio entre los diferentes fabricantes dificultan establecer comparaciones y sacar conclusiones acerca del rendimiento comparativo para el crecimiento bacteriano de cada uno (1).

Suelen emplearse distintos caldos nutritivos en los frascos, como tripticasa soya, peptona suplementada, infusión de cerebro y corazón, caldo Brucella, caldo Columbia, tioglicolato y caldo de peptona suplementado y en ocasiones medios con resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2022.130.s4.6>

ORCID: 0000-0002-9416-0640

BIOCIENTÍFICA INDUSTRIAL CA, Tel: 0058241-8313491 /
0058-4145921472

Autor de correspondencia: Elio Jesús Núñez Tamayo
E-mail: elioluisnunez@gmail.com

Recibido: 9 de julio 2022
Aceptado: 4 de agosto 2022

recibiendo tratamiento antibiótico previo (2). Estudios comparativos han demostrado que no existe un medio de cultivo que pueda considerarse superior a todos los demás (1,2).

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 u hongos que se pueden utilizar en casos específicos (3).

En Venezuela existe una serie de frascos de hemocultivos con una fórmula mejorada de infusión cerebro corazón y tioglicolato con un indicador de positividad, tanto para métodos convencionales como manométricos, cuya marca está registrada con el nombre de hemoBlood®.

En los diferentes métodos de procesamiento de muestra pueden encontrarse frascos con cualquiera de estos caldos de inoculación. Los frascos para hemocultivos principales son similares en todos los sistemas de caldos (1), tanto para los métodos manuales como automatizados.

La mayoría de los frascos de hemocultivo llevan incorporado un anticoagulante, frecuentemente SPS (polianetol sulfonato sódico) a una concentración del 0,006 al 0,050 %. 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.* (1,3).

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 (3).

El medio de cultivo se embotella al vacío con una atmósfera que contiene cantidades variables de CO₂.

Métodos manuales

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 infusión cerebro corazón y caldo tioglicolato y en ocasiones medios con resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico previo.

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°C y los 37°C, la que más se aproxima a la temperatura corporal y la que ha demostrado 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 debe referir en la orden médica y se prolonga el proceso de incubación hasta 4 semanas (1,4).

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. Solo se detecta crecimiento macroscópico a partir de 100 000 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 100 000 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 10 000 UFC/mL. La detección del crecimiento con naranja de acridina es más rápida (4) y permite obviar el Subcultivos ciego rutinario tras las primeras 18-24 horas de incubación (1). A los 7 días de incubación, antes de desechar los frascos como negativos, se realizará un subcultivo ciego. El examen microscópico de hemocultivos sin signos de crecimiento ha demostrado ser de poco valor (1).

2. Bifásico. El frasco para hemocultivo con un medio bifásico está 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.* En la mayoría de los procesos agudos, tras incubar el medio 2-4 días, es posible observar en la fase sólida pequeñas colonias que se deslizan por el agar en forma que recuerdan las lágrimas de cera resbalando por la vela. Una pequeña proporción de casos presenta el crecimiento entre los 5-15 días, y sólo de forma excepcional, este se retrasa hasta pasados 30-45 días (1,5,6).

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 este por un cilindro roscado que contiene distintas superficies con diferentes tipos de agar. Cada día, al inspeccionar el frasco, se invierte este 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. Pero 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 (2).

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 (1,2).

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.

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 fluorquímico inerte. Tras la inoculación de la sangre, esta 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 3 000 rpm durante 30 minutos. Después se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en distintos medios de cultivo (3).

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 (3). 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.

El método de lisis centrifugación es ideal para validar la técnica del tiempo diferencial de positividad en el caso de que sospeche que el origen de la bacteriemia es el catéter y consiste en 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. 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 (3).

5. Manométrico. El método manométrico es el empleado por el sistema Signal de 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 (6).

Sistemas automáticos

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 $36 \pm 1^\circ\text{C}$. 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 (3).

1. Radiométrico y no radiométricos. El Bactec 460 (Becton Dickinson) radiométrico fue el primer sistema comercial de hemocultivos automático. Utiliza sustratos marcados con C^{14} que al ser metabolizado por los microorganismos libera CO_2^{14} al medio, que difunde a la atmósfera del frasco. En esta atmósfera se mide periódicamente el de CO_2^{14} 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 nivel 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.

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. Se basan en la detección de la producción de CO_2 por los microorganismos y difieren en el método de detección de este, 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. Los datos obtenidos en cada lectura se transmiten a un ordenador donde se almacenan y se analizan según sofisticados algoritmos que determinan cuando 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 (2,6,7).

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 CO₂ 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 CO₂ 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. Es un sistema automatizado que permite incubar, agitar y controlar continuamente el crecimiento de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios. Detecta el aumento y/o nivel total de CO₂ 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. 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 (3,6,7).

El sistema BDBACTECTMFX 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 (2,3).

El sistema Vital (bioMerieux) 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 CO₂ que provocan una disminución de la fluorescencia del indicador. Esta fluorescencia se lee cada 15 minutos por medio de un detector diodo/fotón luminiscente no invasor. Algunos trabajos han demostrado una cierta dificultad de este sistema en la detección de las levaduras (7).

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.

Independientemente del método de identificación usado, este siempre debe acompañarse de la realización de un antibiograma directamente o no de la sangre del hemocultivo positivo (3,6).

REFERENCIAS

1. Koneman. Introducción a la microbiología (II) Guías para la recolección, el transporte, el procesamiento, el análisis y el informe de los cultivos a partir de muestras de localizaciones específicas. En: Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Woods, editores. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. Argentina: Editora Medica Panamericana; 2008.p.100-103.

2. Cercenado E, Canton R, editores. Procedimientos en Microbiología clínica. España. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2003. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
3. Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M, Rodríguez Díaz JC. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enferm Infect Microbiol Clín*. 2019;37(5):335-340.
4. Cercenado E, Canton R, editores. Procedimientos en Microbiología clínica. España. Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2018. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia15.pdf>
5. Montes I. Diagnóstico de la Brucelosis. España. Control de la calidad SEIME. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>.
6. Nuñez Tamayo, EJ, Acevedo Pedroza, MS. Interpretación Clínica del informe y resultado del hemocultivo. Biocientífica Industrial. Venezuela. Por aparecer. 2021.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 7ª edición. España: El Sevier; 2014.