

Procesamiento de hemocultivos

Blood culture processing

Heidi Mago de Querales¹, Marlinka Moya²

RESUMEN

El procesamiento de los hemocultivos, una vez llegada la muestra al laboratorio de microbiología, dependerá de las facilidades tecnológicas con las que cuente la institución, y del tipo de microorganismo que se sospeche desde el punto de vista clínico, lo cual debe ser notificado al laboratorio por el equipo tratante. El Microbiólogo con base a estas premisas decidirá temperaturas de incubación, frecuencia y momento de subcultivos y de pruebas de identificación y antibiograma que permitan la más eficaz y oportuna toma de decisiones terapéuticas. Se describe el procesamiento de hemocultivos por métodos manuales y automatizados, así como las variaciones del proceso cuando se requiera aislar e identificar agentes

infecciosos con condiciones especiales de crecimiento, como Bartonella, Legionella, Micobacterias, levaduras, hongos dimórficos y hemoparásitos.

Palabras clave: Hemocultivos, procesamiento, medio de cultivo, bacteriemia.

SUMMARY

The processing of blood cultures, once the sample arrives at the Microbiology Laboratory, will depend on the technological facilities that the institution has, and the type of microorganism that is suspected from the clinical point of view, which must be notified to the Laboratory by the treating team. Based on these premises, the Microbiologist will decide on incubation temperatures, frequency, and timing of subcultures and identification and antibiotic sensitivity tests that allow the most effective and timely therapeutic decision-making. The processing of blood cultures by manual and automated methods is described, as well as the variations of the process when it is required to isolate and identify infectious agents with special growth conditions, such as Bartonella, Legionella, Mycobacteria, yeasts, dimorphic fungi, and hemoparasites.

Keywords: Blood cultures, processing, culture medium, bacteremia.

INTRODUCCIÓN

Una vez recibidas en el laboratorio de Microbiología las muestras para hemocultivos, su procesamiento dependerá del método utilizado

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2022.130.s4.7>

ORCID: 0000-0002-8304-0897¹

ORCID: 0000-0002-4085-3652²

¹Especialista en Infectología. Profesora Titular de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Coordinadora del Posgrado de Infectología de la Universidad de Carabobo en la Ciudad Hospitalaria Dr. Enrique Tejera. Valencia, Venezuela.

²Pediatra Infectólogo. Profesora en el Posgrado de Infectología Pediátrica y Adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas Hospital J.M de Los Ríos. Caracas. Venezuela.

Autor de correspondencia: Heidi Mago de Querales.
E-mail: magoheidi@gmail.com

Recibido: 7 de julio 2022

Aceptado: 5 de agosto 2022

por ese laboratorio, y del tipo de equipamiento que este posea.

La mayoría de los laboratorios actualmente utilizan métodos automatizados. Sin embargo, en países con bajos ingresos, se siguen utilizando métodos manuales (1).

Considerando la situación de nuestras instituciones públicas, e incluso de algunos centros de atención privada, el microbiólogo debe estar familiarizado con estos procedimientos y con su interpretación y reporte. De igual manera, el clínico debe conocer los alcances de cada uno de los métodos y saber cuándo y que esperar de cada uno de los mismos, a los efectos de toma de decisiones terapéuticas.

Aislamiento de bacterias habituales

Métodos manuales

Estos métodos están basados en la detección de los signos de crecimiento en dos frascos con medio de cultivo líquido en los cuales se ha inoculado la sangre del paciente. Los medios de cultivo más frecuentemente utilizados son infusión Cerebro-Corazón, Columbia, Tripticasa de soya y tioglicolato, complementados con anticoagulante (habitualmente Polianetol sulfonato de Sodio (SPS)). Algunos medios comerciales contienen además resinas que neutralizan el efecto de los antimicrobianos que el paciente esté recibiendo.

Los medios comerciales se envasan al vacío, con cantidades variables de CO₂, lo cual permite el desarrollo de microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos. Uno de los dos frascos debe ser ventilado mediante la introducción de una aguja a través del tapón, para permitir la entrada de oxígeno y el desarrollo de microorganismos aerobios.

La incubación se realiza en estufa a temperatura que oscila entre 35 y 37°C, por un período que variará dependiendo del agente que se sospeche desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Se pueden detectar los patógenos más frecuentes entre las 18 a 72 horas de incubación. Sin embargo, la incubación se mantiene habitualmente por dos semanas, tiempo en el cual pueden detectarse la mayoría de los agentes que ocasionan bacteriemia.

Existen algunos microorganismos que requieren mayor tiempo de incubación, como es el caso de hongos, *Brucella* y algunos agentes de endocarditis del grupo HACEK. En estos casos, dependiendo de los hallazgos clínicos y epidemiológicos, la muestra debe ser incubada por tiempo prolongado (hasta 4 semanas).

Los frascos inoculados son revisados a diario en busca de turbidez, hemólisis u otras evidencias de crecimiento bacteriano. Sin embargo, con métodos manuales la posibilidad de detectar turbidez solo es posible cuando la concentración de bacterias es de 10 UFC por mililitro. Adicionalmente la hemólisis puede ocasionar confusión.

El uso de métodos automatizados es el estándar de oro en el procesamiento de hemocultivos, pues acelera la posibilidad de detectar crecimiento bacteriano, y por tanto permite adelantar la apropiada respuesta para el manejo del caso.

Una vez detectado el crecimiento, se extraen del frasco 3 a 5 mL bajo estrictas condiciones de asepsia para la realización de tinción de Gram e inoculación en medios sólidos, enriquecidos, que variarán de acuerdo con el agente sospechado, de manera que permitan el aislamiento e identificación posterior de los microorganismos. Estos medios sólidos se incubarán en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

En dependencia de los hallazgos en la tinción de Gram, el microbiólogo seleccionará el o los medios más apropiados para facilitar el crecimiento del agente, y podrá realizar pruebas rápidas que agilicen su identificación.

El material debe ser subcultivado en diferentes medios enriquecidos (agar sangre, agar chocolate) ofreciendo ambiente de aerobiosis, anaerobiosis y 5 % de CO₂.

De detectarse en la tinción de Gram la presencia de levaduras, es recomendable además realizar el subcultivo en medios específicos para hongos, como el agar Sabouraud. De igual manera, si en la tinción de Gram se observan bacilos Gram negativos, se deberá subcultivar el agar McConkey u otro medio selectivo para Gram negativos que facilite su identificación. Resumimos a continuación el procedimiento de los hemocultivos de manera manual o convencional.

Convencional. Una vez recibido el set de frascos con medio de cultivo líquido, seleccionados según la sospecha clínica, e inoculados con sangre del paciente, se procede de la siguiente manera:

Se introducen en incubadora a una temperatura entre 35 y 37°C lo que se aproxima a la temperatura corporal y permite mayor aislamiento de microorganismos. En algunos casos se utiliza temperatura de incubación diferente, lo cual será comentado en la sección de microorganismos con requerimientos especiales.

A diario se observan los frascos para vigilar los signos sugestivos de crecimiento bacteriano: enturbiamiento del medio, hemólisis de los hematíes, producción de gas o la formación de colonias en el fondo del frasco.

El tiempo de incubación varía desde 48 horas hasta 5 días, para microorganismos habituales, y en este tiempo, se espera, observar los cambios de crecimiento bacteriano descritos.

Tan pronto se observen cambios en el medio de cultivo, se retira de la incubadora el o los frascos.

Se desinfecta la tapa del frasco de hemocultivo con el desinfectante apropiado y se deja secar.

Se introduce en cada uno de los tapones de goma de los frascos una aguja con su jeringa, se invierten los frascos con una ligera agitación y se extraen de los mismos aproximadamente 2 mL de caldo que se emplean para la realización primero de los subcultivos en medios sólidos y después para la tinción de Gram, naranja de acridina u otra según amerite el caso. Este procedimiento debe realizarse en la cabina de seguridad biológica. Debido a que causas diferentes al crecimiento bacteriano pueden producir cambios macroscópicos en el medio de cultivo y que algunos microorganismos crecen sin producir tales cambios, es necesaria la visualización microscópica del cultivo, con su respectiva coloración antes de descartarlos como negativos (2-4).

Existen pequeñas modificaciones de este método convencional, que, realizadas antes de la incubación, mejoran la capacidad de aislamiento, las cuales se describen a continuación:

Método bifásico: consiste en la utilización de frascos con medios bifásicos compuesto de una

fase sólida y otra líquida con dos variaciones en el mercado: Septi-Check® (Hoffman-La Roche) y el Opticult® (Becton-Dickinson) que permite realizar un subcultivo simultáneamente, mejora el aislamiento de *Brucella spp.*, pero no se utiliza en anaerobios (2).

Método de Lisis-filtración: se procede a lisar las células sanguíneas, luego se filtra la sangre para retener las bacterias, luego fragmentos del filtro contenedor de las bacterias, se siembran en distintos medios de cultivo. Este método requiere elevado tiempo de manejo en el laboratorio, por lo que no se realiza de rutina (2).

Método de lisis-centrifugación: en este método se utiliza un frasco que contiene un líquido fluoroquímico inerte, saponina como agente lisante, polipropilenglicol como agente antiespumante, polianetol sulfonato sódico (SPS) y EDTA como anticoagulantes. Al inocular la sangre en el frasco, esta se mezcla con el líquido para conseguir la lisis de las células, y luego, para separar los microorganismos y los elementos sanguíneos, se centrifuga el tubo a 3 000xg durante 30 minutos, se elimina el sobrenadante, y el sedimento se siembra en diferentes medios de cultivos. Este método permite una mayor recuperación de microorganismos y más rapidez que con el método convencional, y es recomendado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) para el cultivo de *Legionella sp.* y *Bartonella sp.* (2,4).

En cualquiera de los métodos descritos, la siembra se realiza en diferentes medios sólidos a seleccionar según la sospecha clínica, se incuban a temperatura entre 35-37°C, con posterior recuperación de las colonias, usando asa de platino, para su extendido en lámina de portaobjetos, coloración de Gram u otra y visualización al microscopio para su identificación preliminar.

Es importante saber, que los frascos de hemocultivo que lleven incorporado SPS como anticoagulante, a una concentración del 0,006 % al 0,050 %, inhiben la actividad bactericida del suero humano y puede dificultar el crecimiento de algunos microorganismos como *Neisseria spp.* (2).

En la actualidad, contamos con múltiples sistemas automatizados, que disminuyen la manipulación de los cultivos y el riesgo de

contaminación, aumentan la capacidad de aislamiento, y a través de métodos moleculares y de espectrometría de masa, se logran identificar en tiempo récord.

Métodos automatizados

A diferencia de los métodos manuales, los métodos automatizados, cuentan con mecanismos que detectan de forma automática la presencia de crecimiento bacteriano en los frascos incubados en el sistema, generando posteriormente una alarma o marca lumínica para señalar esto.

Existen diferentes sistemas en el mercado, los cuales detectan la producción de CO₂ de los microorganismos por diferentes métodos que varían según modelo y marca del equipo: Radiométrico, infrarrojos, fluorescencia, colorimétrico, manométrico. Cada uno de estos sistemas de hemocultivo se diferencian uno del otro, no solo por el método de detección de CO₂ utilizado, sino, en la capacidad de los frascos, en el tipo de medio de cultivo utilizado que puede ser Caldo soja-caseína; Caldo cerebro-corazón; Caldo peptona soja-caseína o Proteosa-peptona, también en la frecuencia de lectura de los frascos, pudiendo ser esta a los 10, 12 o 15 minutos. Además, cada sistema cuenta con diferencias en la capacidad máxima de sus incubadores (2).

Cada Sistema, viene con indicaciones de su fabricante, sobre como cargar o descargar los frascos de hemocultivo pre y pos incubación. La Temperatura de incubación es 35 - 37°C. Al igual que el método convencional, los frascos que el sistema ha detectado como positivos deben manipularse en la cabina de seguridad biológica. Una vez detectado un frasco como positivo, se retira de la incubadora, según especificaciones del fabricante, y se realiza procesamiento tal como fue descrito en el método convencional, respetando el protocolo que establezca cada laboratorio (5).

Cuando se utilizan medios y sistemas de cultivo de sangre automatizados e monitoreo continuo, es posible una respuesta en menor tiempo al detectarse el crecimiento más precozmente, obteniendo resultados positivos dentro de las 48 horas de incubación, rara vez requieren más de 5 días de incubación incluso para microorganismos exigentes. Además, los métodos automatizados,

ofrecen como ventaja el poder procesar una mayor cantidad de muestras y algunos cuentan con un kit de identificación bioquímica que al ser analizados por lectores ópticos, permiten detectar cambios de color que a su vez facilitan la identificación de especies (4).

Como dato adicional, se conoce que *Streptococcus pneumoniae* y otros organismos grampositivos y organismos anaeróbicos facultativos pueden crecer mejor en la botella anaeróbica (tiempo de detección más rápido) (4). Para minimizar el riesgo de autólisis de ciertos organismos como *S. pneumoniae*, los frascos deben subcultivarse lo antes posible después de una señal positiva (5).

Señal de instrumento de falso positivo

Se define como falso positivo, aquella botella marcada por el sistema, que no contiene ningún microorganismo. Esto puede ocurrir por la presencia de recuentos altos de leucocitos, frascos sobrellenados y/o errores en la incubación. Estas botellas con falsos positivos requieren una reincubación en el sistema dentro de la hora siguiente a su descarga para reanudar el análisis de la botella (6).

Señal del instrumento falso negativo

Se define como una botella marcada como negativa por el sistema, aunque contiene bacterias u hongos. La causa principal de un falso negativo es por retraso de la inserción del frasco inoculado al sistema automatizado de cultivo. La señal de falso negativo también depende de la temperatura a la que se mantuvieron los frascos antes de insertarlos al sistema, el tipo de microorganismo involucrado y el instrumento de emparejamiento/tipo de frasco utilizado. En general, la tasa de señales negativas falsas puede ser mayor cuando la temperatura de preincubación es de 35°C, la duración de la preincubación es superior a las 24 h, con *Streptococcus sp.*, *Candida sp.* o *Pseudomonas*, y con sistemas Bactec. Una duración de preincubación < 12 h mantiene el riesgo de falsos negativos al mínimo (6).

Resulta de suma importancia determinar si el o los agentes aislados son producto de

PROCESAMIENTO DE HEMOCULTIVOS

contaminación durante la obtención de la muestra o de su procesamiento en el laboratorio, ya que esta circunstancia puede condicionar uso inapropiado de antimicrobianos y promover aparición de cepas resistentes (7).

Microorganismos con requerimientos especiales

Algunos microorganismos, como las micobacterias y los hongos dimórficos, requieren períodos de incubación más prolongados; otros pueden requerir medios de cultivo especiales o métodos de identificación no basados en cultivos.

Aunque los hongos filamentosos a menudo requieren medios de cultivo especiales o viales de lisis-centrifugación para la detección, la mayoría de las *Candida spp.* crecen muy bien en medios de hemocultivo estándar a menos que el paciente haya estado en terapia antifúngica (4).

En el Cuadro 1 (*Public Health England, National Health Service, Public Health Wales, 2019, p. 34-35*), se encuentra muy bien resumidos los diferentes requerimientos para hemocultivos, tanto para bacterias habituales, así como aquellos microorganismos con requerimientos especiales, diferentes de micobacterias.

Cuadro 1

Clínica/ condiciones	Muestra	Medio Estándar	Incubación Temperatura °C	Atmósfera	Tiempo	Lectura del cultivo	Organismo Diana
Todas las condiciones clínicas	Sangre	Agar sangre † Agar anaerobio fastidiosos	35-37 35-37	5 %-10 % CO ₂ Anaeróbica	40- 48h* 40- 48h*	Diario ≥40h y hasta 5d	Cualquier organismo puede ser significativo
Para estas situaciones, agregue lo siguiente							
Clínica/ condiciones	Muestra	Medio Estándar	Incubación Temperatura °C	Atmósfera	Tiempo	Lectura del cultivo	Organismo Diana
Sospecha de meningococemia o meningitis por diplococos o pequeños bacilos Gram negativos visto en microscopio	Sangre	Agar Chocolate†	35 - 37	5 %-10 % CO ₂	40- 48h*	Diario	<i>Haemophilus species</i> <i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>
Bacilos Gram negativos visto al microscopio	Sangre	MacConkey/ agar CLED o agar cromogénico	35 - 37	Aire	16-24h	≥16h	<i>Enterobacteriaceae</i> Organismos No-fermentadores <i>Pseudomonas species</i>
Microscopia sugestiva de infección mixta o por anaerobios	Sangre	Agar Neomicina anaerobios fastidiosos con disco de metronidazol de 5µg	35 - 37	Anaeróbica	5-7d	≥40h y a los 5d	Anaerobios
Infección fúngica sistémica #	Sangre	Agar Sabouraud	28 - 30	Aire	5d	2 d y 5 d	Levaduras Mohos

Continúa en la pág. S841...

...continuación del Cuadro 1.

Clínica/ condiciones	Muestra	Medio Estándar	Incubación Temperatura	Atmósfera	Tiempo	Lectura del cultivo	Organismo Diana
Cultivo primario negativo y curva de crecimiento positivo ‡ (subcultivo todas las botellas)	Sangre	Agar sangre	35 - 37 35 - 37 35 - 37	Micro aeróbica 5 %-10 % CO ₂ anaeróbica	5d 40- 48h 5d	≥3d y 5d ≥40h ≥40h y a los 5d	<i>Campylobacter sp.</i> <i>Helicobacter sp.</i> <i>Abitrophia sp.</i> organismos anaerobios Dependiente de cisteína
		Agar sangre con racha de <i>S. aureus</i> (NCTC 6571) Agar anaerobios fastidiosos					
		MacConkey/ agar CLED	35 - 37	Aire	16- 24h	≥16h	Organismos Dependiente de cisteína

Nota: traducido y adaptada de: UK Standards for Microbiology Investigations Investigation of blood cultures (for organisms other than Mycobacterium species) by Public Health England, National Health Service, Public Health Wales: London, 2019.p.34-35 (3).

†Se puede agregar un disco de optoquina si se observan estreptococos en el microscopio.

*La incubación puede extenderse hasta 5 días si es probable que haya un falso negativo o si está clínicamente indicado; en tales casos placas debe leerse a las ≥40 horas y dejarse en la incubadora/gabinete hasta por 5 días.

‡Es posible que sea necesario considerar otros organismos.

#Donde esté clínicamente indicado, los frascos de hemocultivo pueden requerir una incubación prolongada de hasta tres semanas para especies de *Cryptococcus* y hasta seis semanas para especies de *Histoplasma*

Bartonella spp.

La tasa de éxito para la recuperación de *Bartonella spp.* de la sangre, incluso cuando se utilizan métodos óptimos, es extremadamente baja. Requiere la inoculación de 10 mL de sangre en cada frasco de cultivo tipo lisis-centrifugación, se requieren 2 frascos. Los tubos de cultivo de lisis-centrifugación deben transportarse a temperatura ambiente al laboratorio lo antes posible y ser procesados dentro de las 8 h de inoculación de sangre (3). Se procesa según lo descrito en la sección de métodos convencionales para lisis-centrifugación. Seguido a la centrifugación, con el sedimento se realiza un subcultivo.

- El subcultivo debe hacerse en medio fresco de agar sangre o chocolate.
- Sellar las placas pasadas las primeras 24 horas. Incubar a 35-37°C en 5 %-10 % de CO₂ con 40 % de humedad.
- El tiempo de incubación es de 30-40 días.
- *Bartonella spp.* 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 (2).

Legionella spp.

La bacteriemia por *Legionella spp.* ocurre con poca frecuencia y rara vez se recupera el organismo de la sangre, incluso cuando se emplean técnicas de cultivo óptimas. Este microorganismo requiere 2 o más tubos de hemocultivo de lisis-centrifugación al que se le deben inocular 10 mL de sangre por tubo. Luego de la inoculación, deben ser transportados a temperatura ambiente al laboratorio lo antes posible y procesado dentro de las 8 h de inoculación de sangre (2,4).

Aislamiento de hongos/Leishmania

El aislamiento de hongos y protozoarios a partir de muestras de hemocultivo exige por parte

del microbiólogo del uso de medios de cultivo específicos, los cuales deben ser seleccionados con base a la sospecha clínica expresada en la solicitud de estudio, la cual debe especificar elementos clínicos y de epidemiología que orienten para la selección de los mismos.

Levaduras

Entre las levaduras de interés clínico destaca *Candida spp.* como productora de fungemia, siendo su confirmación microbiológica difícil, porque los hemocultivos pueden ser negativos hasta en el 50 % (9). Por esto han surgido métodos de detección antigénica, de anticuerpos o componentes estructurales de los hongos, fundamentalmente en muestras séricas. Entre estos se encuentran detección de manano/antimanano, el anticuerpo del tubo germinal de *Candida albicans*, el 1,3-D-glucano. Los valores predictivos positivos de estas pruebas son bajos cuando se evalúan en forma independiente de cultivo y los valores predictivos negativos son altos (9). La espectrometría de masas MALDI-TOF directa de los hemocultivos permite la identificación rápida de especies, y la resonancia magnética T2 está siendo ampliamente investigada con el objetivo de permitir una detección y caracterización rápida de la candidiasis invasora (10). Sin embargo, el Hemocultivo sigue siendo el principal método de diagnóstico para determinar la etiología de una candidemia u otra fungemia (4,8-10).

Tipo de muestra requerida

En adultos: 2 a 4 sets de hemocultivos o 20 a 30 mL de sangre inyectados en al menos 2 frascos de hemocultivo.

En lactantes y niños: 2 o más juegos de hemocultivos, la cantidad de sangre, depende del peso del niño.

Los organismos generalmente sobrevivirán en viales de cultivo inoculados incluso si no se incuban inmediatamente.

Los viales de cultivo inoculados deben transportarse lo antes posible a temperatura ambiente al laboratorio para la incubación temprana. Una vez en el laboratorio, se

procesan igual que otros hemocultivos bien sea por sistema convencional o automatizado. En donde esté disponible se puede utilizar un ensayo de resonancia magnética por T2 a los viales inoculados para detección directa de *Candida spp.* (4).

Cuando se sospecha de *Malassezia spp.* se recomienda utilizar el método lisis-centrifugación para su recuperación, adicionalmente requiere suplementos de lípidos (4). Además, este microorganismo y otros hongos dimórficos y levaduras pueden visualizarse en frotis de sangre periférica en algunos pacientes usando una variedad de tinciones fúngicas, para lo cual se debe solicitar este estudio directamente al laboratorio de microbiología (4).

Dado que las levaduras son altamente aerobias, cuando se sospecha fungemia causada por estas, podría ser prudente inocular al menos 1 muestra de sangre en 2 viales aerobios, en lugar del habitual par de viales aeróbicos y anaeróbicos. También se pueden usar un caldo de cultivo diseñado para mejorar el rendimiento de las levaduras por ej., MycoF/Lytic o se puede utilizar el método lisis-centrifugación (4).

Los hemocultivos deben ser procesados apenas se evidencien signos de crecimiento o el sistema automatizado comunique positividad.

- Se debe realizar un examen directo por microscopía con tinción de Gram y un subcultivo en diferentes medios de cultivo (agar sangre, agar Sabouraud) intentando, hacer la identificación y pruebas de susceptibilidad lo antes posible. Tras el examen se realizará el reporte de presencia de blastoconidios o pseudohifas y células levaduriformes (7).

Si se sospecha de una infección fúngica, por lo observado en la tinción Gram o por la clínica del paciente, se debe subcultivar no solo en medios tradicionales de cultivo como sangre y McConkey sino, también en una placa de agar Sabouraud y/o placas con medios cromogénicos para aislamiento de agentes fúngicos (7).

Hongos filamentosos y dimórficos

Muestra requerida; 2 o más frascos de lisis centrifugación, inoculados cada uno con 10 cm³ de sangre. La muestra debe transportarse lo antes

posible al laboratorio, y procesarse en las 8 horas siguientes a su inoculación.

El método de lisis-centrifugación ha demostrado una gran efectividad para recuperar hongos, especialmente *Histoplasma capsulatum*, ya que permite seleccionar los medios de subcultivo (2).

Si se sospecha que el agente causal es un hongo dimórfico o filamentoso la incubación es hasta por 30 días a 22-30°C con un subcultivo final antes de descartar como negativo.

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* (2).

Micobacterias

El aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en sangre no es un hecho común, y la detección del microorganismo, sigue siendo por baciloscopia en muestras respiratorias o tejidos, sin embargo, desde la aparición del VIH se hizo cada vez más frecuente el aislamiento del mismo en sangre, por lo que está indicada su investigación en pacientes en los que se sospeche enfermedad diseminada por el mismo (1). En tal sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 propuso un algoritmo para diagnosticar la tuberculosis en pacientes gravemente enfermos, con baciloscopia negativa que presentaran tos de 2 a 3 semanas y ≥ 1 signo de peligro como frecuencia respiratoria > 30 respiraciones/minuto, frecuencia cardíaca > 120 latidos/minuto, temperatura $> 39^\circ\text{C}$ y no poder caminar sin ayuda, a quienes se le debe indicar Hemocultivo para micobacterias (11).

En la actualidad se pueden cultivar en sistemas de monitorización continúa utilizando 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. También 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 (2).

Se requieren frasco de cultivo con medio específico para bacterias ácido-alcohol resistentes, inoculados con 5 mL de sangre. Los viales de cultivo inoculados deben transportarse al laboratorio lo antes posible para una incubación temprana (4).

Parásitos

En muy contadas ocasiones se requiere de hemocultivos para el aislamiento e identificación de protozoarios. La microscopía sigue siendo la piedra angular de las pruebas de laboratorio para la identificación de la mayoría de los parásitos sanguíneos y muchos parásitos tisulares (4). La viabilidad y la morfología del organismo pueden verse afectadas negativamente por varios factores diferentes, como temperatura, humedad y exposición a fijadores o anticoagulantes. En esta sección se hablará de los que se pueden aislar por hemocultivo.

Los ensayos moleculares pueden ser de particular utilidad en pacientes con parasitemias muy bajas o en la identificación específica de organismos que no pueden diferenciarse microscópicamente.

En situaciones en las que la infección es potencialmente mortal, bien sea por hongos, micobacterias o parásitos, las pruebas iniciales se deben realizar en laboratorios locales y se debe considerar el tratamiento empírico mientras se esperan los resultados del laboratorio de referencia (4).

Tripanosoma cruzi

El cultivo se debe realizar en medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) de fácil preparación o medios similares de cualquier muestra adecuada, bien sea sangre o tejido durante las etapas aguda y crónica, lo que aumenta la sensibilidad del diagnóstico de laboratorio. Este tipo de hemocultivo puede estar disponible en laboratorios de referencia especializados. Los tripanosomas vivos son altamente infecciosos y las muestras deben manipularse con cuidado

utilizando las “precauciones estándar” para el manejo de sangre y fluidos corporales (4). Posterior a la incubación, se observan con microscopia pudiendo observarse tripanosomas móviles.

La muestra óptima es sangre con anticoagulante o capa leucocitaria, aspirados de tejido y biopsias de tejido, las muestras frescas deben inocularse directo al medio de cultivo, realizando el transporte tan pronto como sea posible al laboratorio, preferiblemente dentro de 1 h de la recolección para la preservación de la viabilidad del organismo, obteniéndose resultados en 2 a 6 días (4).

Leishmaniasis visceral

Para el diagnóstico de enfermedad sistémica por este microorganismo, junto a la clínica y epidemiología, se toman en cuenta diferentes métodos como examen microscópico de aspirado/biopsia de médula ósea teñida con Giemsa, aspirado esplénico; el cultivo, la PCR y la serología. La serología positiva para rK39 es tanto sensible como específica para el diagnóstico de leishmaniasis visceral en varias áreas endémicas del mundo (4).

Sin embargo, si se va a realizar hemocultivo, el medio clásico utilizado es el NNN, al cual hay que añadir una tercera parte de su volumen de sangre desfibrinada de conejo. Es algo laborioso de preparar y fácil la contaminación de este. 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 (2).

REFERENCIAS

1. Ombelet S, Barbé B, Affolabi D, Ronat J-B, Lompo P, Lunguya O, et al. Best Practices of Blood Cultures in Low and Middle-Income Countries. *Front Med.* 2019;6:131.
2. Loza Fernández de Bobadilla E, Planes Reig A, Rodríguez Creixems M. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica. Hemocultivos. 2003;3a:5-8.
3. Public Health England, National Health Service, Public Health Wales: UK Standards for Microbiology Investigations Investigation of blood cultures (for organisms other than Mycobacterium species). London: The Network; 2019. Disponible en https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/979833/B_37i8.2.pdf.
4. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):e1-e94.
5. 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 Infecc Microbiol Clín.* 2019;37(5):335-340.
6. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol.* 2016;7:697.
7. Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp MC, Weinstein MP, et al. Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. 2019;33(1):e00009-19.
8. Salas Cifuentes V. Diagnóstico microbiológico de candidiasis invasoras a partir de hemocultivos. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile. 2020:3-11.
9. Clancy C, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5):e01909-17.
10. Posch W, Heimdörfer D, Wilflingseder D, Lass-Flörl. Invasive candidiasis: future directions in nonculture-based diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(9):829-838.
11. Griesel R, Stewart A, van der Plas H, Sikhondze W, Rangaka MX, Nicol MP, et al. Tuberculosis Diagnosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Inpatients Meeting the Criteria of Seriously Ill in the World Health Organization Algorithm. *Clin Infect Dis.* 2018;66(9):1419-1426.