DEPARTAMENTO DE APOYO AL DIAGNOSTICO

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

GUIA DE PROCEDIMIENTOS

HEMOCULTIVOS

R. RAMOS M

A. ROJAS

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 ..... **5**
BACTERIEMIA Y FUNGEMIA **7**
Tipos de bacteriemia 8
Incidencias de la bacteriemia 10
Diagnóstico 11
CAPÍTULO 2 ..... **13**
HEMOCULTIVOS **15**
Indicaciones 15
Extracción 15
Venopunción 17
Volumen de la extracción 20
Modo de extracción 21
CAPÍTULO 3 ..... **23**
RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA **25**
Transporte 25
Recepción 26
CAPÍTULO 4 ..... **29**
PROCESAMIENTO **31**
Métodos manuales 31
Sistemas automáticos 35
CAPÍTULO 5 ..... **39**
CULTIVO **41**
Procedimiento 41
Medios de cultivo 41
Informe preliminar 44
CAPÍTULO 6 ..... **45**
LECTURA **47**
Resultados 47
Bacteriemia verdadera 48
Falsa bacteriemia 48
Pruebas 49
Informe definitivo 50
CAPÍTULO 7 ..... **51**
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD **53**
Tipos de pruebas 53
Antibiograma disco-placa 53
Método el Epsion-Test (E-Test) 56
Métodos de dilución 59
CAPÍTULO 8 ..... **65**
TINCIÓN DE GRAM **67**
Procedimiento 67
Resultados 71
CAPÍTULO 9 ..... **75**
PRUEBAS DE DETERMINACIÓN **77**
Prueba de la oxidasa 77
Prueba de la catalasa 78
Prueba de aglutinación en látex 79

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

Betalactamasa de espectro extendido (BLEE) 80
CAPÍTULO 10 ..... **83**
MICROORGANISMOS **85**
Staphylococcus aureus 85
Enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus* 86
Epidemiología 87
Prevención 88
Escherichia coli 89
Enfermedades causadas por Escherichia coli 90
Epidemiología 90
Tratamiento 91
Klebsiella spp. 91
Klebsiella pneumoniae 91
Enfermedades causadas por *Klebsiella pneumoniae* 92
Epidemiología 92
Tratamiento 93
Neisseria meningitidis 94
Diagnóstico 95
Epidemiología 95
Patogénesis 96
Manifestaciones clínicas 97
Diagnóstico 98
Tratamiento 98
Enterobacter spp. 99
Epidemiología 99
Infecciones por *Enterobacter* spp. 100
Tratamiento 100
Serratia spp. 101
Patologías causadas por *Serratia* spp. 102
Epidemiología 103
Tratamiento 103
Pseudomonas aeruginosa 104
Epidemiología 105
Infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa* 107
Tratamiento 108
Acinetobacter baumannii 108
Epidemiología 109
Infecciones causadas por el *Acinetobacter baumannii* 110
Tratamiento 110
Streptococcus pneumoniae 111
Infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* 112
Epidemiología 112
Tratamiento y prevención 113
Proteus mirabilis 115
Patogénesis 115
Enfermedades causadas por el *Proteus miriabilis* 116
Tratamiento 116
Microorganismos contaminantes 117
BIBLIOGRAFÍA **119**

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. GÁLVEZ C.

A. GALETTI

BACTERIEMIA Y FUNGEMIA

La bacteriemia es la presencia de bacterias en sangre. Hay que tener en cuenta que la sangre es un lugar hostil para las bacterias, y esto es debido a nuestro sistema inmunológico. Por eso, cuando en un análisis se detecta presencia de bacterias en sangre, es señal de infección. Dicha presencia se confirma cuando la bacteria se aisla mediante un hemocultivo.

Hablamos de fungemia cuando nos referimos a la presencia de hongos en sangre.

La detección de bacteriemia y fungemia se asocia a una alta cifra de mortalidad (20-50%). Es, por tanto, una tarea diagnóstica muy importante en el laboratorio de microbiología a la que se le da prioridad.

Tanto la bacteriemia como la fungemia se producen cuando una bacteria o un hongo entran en el torrente sanguíneo. En ambos casos, hablamos de complicaciones graves de infecciones por bacterias o por hongos, en los que el ritmo de crecimiento de estos microorganismos en sangre supera la capacidad que tiene el sistema reticuloendotelial para eliminarlos.

Las bacterias pueden entrar en el torrente sanguíneo debido a una fuerte complicación de infección, como la neumonía o la meningitis. También durante el transcurso de una cirugía y mediante el uso de catéteres, agujas, o cualquier otro objeto externo que entre en una arteria o vena.

En el caso de los hongos, se da más en pacientes con inmunosupresión o inmunodeficiencia con una agranulocitosis (disminución del número de neutrófilos) severa. También en enfermos de cáncer, por el uso de catéteres, o en pacientes que deben tomar determinadas drogas.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. SILVEZ C.

A. CASTRO

Tipos de bacteriemia

Podemos tener dos tipos de bacteriemia:

- Falsa bacteriemia
- Bacteriemia verdadera

Aún hoy en día, es difícil dar una definición exacta de cada una de ellas, puesto que no hay un criterio universal que designe tanto a la una como a la otra. No obstante, los más utilizados son:

Falsa bacteriemia: se da cuando hay contaminación al tomar la muestra o al procesarla. Hay crecimiento de microorganismos en el hemocultivo, pero que no causan bacteriemia verdadera.

Bacteriemia verdadera: se considera bacteriemia verdadera cuando:

a Un microorganismo que no es causa habitual de contaminación en los hemocultivos, se aisla en, al menos, un hemocultivo de un paciente. En este caso, es importante comprobar que el cuadro clínico es compatible con la bacteriemia. Los microorganismos podrían ser:

1 *S. aureus*

2 Enterobacterias

3 *P. aeruginosa*

4 *S. pneumoniae*

b Un microorganismo que es contaminante habitual de los hemocultivos se aísla en dos tandas de hemocultivos obtenidas en punciones distintas de vena periférica o de vena periférica y catéter. En este caso, también hay que comprobar que el cuadro clínico del paciente es compatible con la bacteriemia. Además, en el caso de detectar ECN, hay que comprobar también que la especie y el antibiotipo de los dos hemocultivos positivos sean idénticos. Los microorganismos, serían:

1 ECN

2 Estreptococos del grupo *viridans*

3 *Corynebacterium* spp.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Cá

4 *Bacillus* spp.

5 *Propionibacterium acnes*

6 Algunas especies de *Clostridium*

La complicación surge cuando en una sola tanda de hemocultivos tomada de una vena periférica se aísla un microorganismo potencialmente contaminante, y estas muestras provienen de un paciente que tiene, por un lado, un cuadro clínico compatible, y por otro, un catéter venoso o algún dispositivo intravascular. En este caso, hay que repetir los hemocultivos, teniendo en cuenta las siguientes pautas:

- Si al retirar el catéter, en el cultivo de la punta se aísla el mismo microorganismo, estamos ante una bacteriemia verdadera
- Si al retirar el catéter, y antes de ser cultivado, el cuadro clínico desaparece, estamos ante una bacteriemia verdadera probable
- Si el hemocultivo se tomó del catéter, podríamos estar ante una contaminación, aunque ha que verificar repitiendo los hemocultivos
- Si no hay compatibilidad entre el cuado clínico y el tipo de microorganismo infeccioso, es muy probable que se trate de contaminación

Los microorganismos no aparecen siempre de la misma manera en sangre, si no que pueden estar de forma transitoria, de forma continua o a intervalos intermitentes. Es por eso que la bacteriemia verdadera se clasifica en:

a. Transitoria

b. Persistente

c. De brecha

No obstante, no es una clasificación práctica a la hora de dar en el laboratorio, ya que los limites entre una y otra son dificiles de establecer.

Hablamos de bacteriemia verdadera transitoria cuando se limita de forma espontánea en un plazo de 8-12 horas.

R. RAMOS M A. ROJAS

K. JAIVEZ C. A. CRUZ

La bacteriemia verdadera persistente es aquella que no varía de estado a pesar de que se da un tratamiento adecuado.

El término bacteriemia de "brecha" se emplea cuando ésta se presenta en un paciente que está recibiendo un tratamiento adecuado con antimicrobianos a los cuales es sensible el microorganismo aislado, y cuando los hemocultivos previos ya eran negativos. Este tipo de bacteriemia puede darse bien porque haya una concentración inadecuada del antimicrobiano en la sangre, resistencia del microorganismo al tratamiento antimicrobiano, endocarditis o infección endovascular, un mal drenaje del foco de infección o deterioro de las defensas del huésped, entre otras posibles causas más.

Incidencias de la bacteriemia

La bacteriemia puede darse a cualquier edad.

Suele presentarse en pacientes que padecen una grave enfermedad en las que se da una alteración en los mecanismos inmunológicos que hacen frente a la infección.

Los focos más frecuentes son:

- Heridas quirúrgicas
- Tracto genitourinario
- Catéteres intravasculares
- Abscesos
- Tracto biliar

Hay que añadir que, todavía, hay un índice del 25% de casos en los que nos encontramos ante un foco de infección desconocido.

Son muchos los microorganismos que pueden invadir el torrente sanguíneo. Hoy en día, los grampositivos igualan, e incluso a veces superan, a los microorganismos gramnegativos a la hora de una bacteriemia. Las causas pueden ser varias. Por ejemplo:

- El uso de métodos de diagnóstico invasores
- Empleo de antibióticos de amplio espectro

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
A. Cal

- Catéteres intravasculares, sobre todo cuando se hace un so generalizado de ellos

Además, han aparecido casos de bacteriemia que en el pasado eran raros o prácticamente inexistentes, debido al aumento de pacientes inmunodeprimidos ya sea por tratamientos antineoplásicos o por infección del VIH.

La respuesta inmunológica a la bacteria puede causar sepsis (envenenamiento de sangre) y shock séptico, teniendo este último un alto nivel de mortalidad. Las bacterias también pueden usar el torrente sanguíneo para llegar a otras partes del cuerpo; es el llamado esparcimiento hematógeno que causa infecciones en zonas lejanas a lugar original de la infección, como la endocarditis y la osteomielitis. El tratamiento se hace con antibióticos, aunque también puede hacerse una prevención con antibióticos profilácticos en situaciones en las que se esperan los problemas de la infección.

Diagnóstico

Para hacer un diagnóstico de la bacteriemia, hay que realizar un cultivo de la sangre del paciente, no sólo para conocer el microorganismo causante de la infección, sino también para saber su sensibilidad a los antimicrobianos y así poder, o bien aplicar un tratamiento, o saber si hay que modificar el que se estaba empleando. Además, permite diferenciar entre una bacteriemia verdadera y causas de contaminación por una inadecuada extracción o procesamiento de la muestra.

Hay bacterias que están asociadas a determinadas enfermedades. Es el caso de la neoplasia de colon, en la que se da la presencia del *Streptococcus Boris*; infección por el VIH, en la que aparecen el enterococo y la *Salmonella*; o la endocarditis, en la que encontramos estreptococos del grupo *viridans*. Por tanto, el aislamiento mediante cultivo también permite diagnosticar esta serie de enfermedades, entre otras.

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
A. CARDIN

CAPÍTULO 2

Hemocultivos

HEMOCULTIVOS

Se llama hemocultivo al cultivo de microorganismos presentes en la sangre, a través del el cual se detectan infecciones transmisibles por el torrente sanguíneo.

Indicaciones

- Pacientes con fiebre ≥ 38º C. o cuya temperatura sea inferior a 36º C.
- Pacientes con leucocitosis o leucopenia
- Pacientes con trombopenia o alteraciones de la coagulación de causa desconocida
- Pacientes con infección focal de causas no claras
- Pacientes con deterioro uni o multiorgánico, shock o inestabilidad hemodinámica
- Neonatos ante la mínima sospecha de infección.

Extracción

El procedimiento del hemocultivo comienza con la extracción de sangre. Esta se obtiene mediante venopunción, por la que se obtienen unos 10 ml. de sangre, aproximadamente. Estos 10 ml. se reparten entre dos frascos, uno para gérmenes aerobios y otro para anaerobios, contando cada uno de ellos con un medio de cultivo específico.

Cuando la extracción se realiza en niños, sólo se usa una botella.

La extracción ha de realizarse antes de que se administre el tratamiento antimicrobiano, y siempre que exista sospecha de:

- Sepsis
- Meningitis
- Artritis

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. C

- Neumonía
- Osteomielitis
- Pielonefritis
- Infección intraabdominal
- Endocarditis
- Infecciones graves de la piel y tejidos blandos
- Fiebres de origen desconocido

Los signos que pueden llevar a sospechar de que se de alguna de estas patologías son:

- Fiebre o hipotermia en el caso de neonatos y ancianos
- Escalofríos
- Shock
- Leucocitosis o granulocitopenia

Deterioro de uno o varios órganos por causas desconocidas

El cultivo de sangre se debe complementar dependiendo del tipo de enfermedad que se sospeche:

Líquido cefalorraquídeo	**Meningitis**
Orina	**Pielonefritis**
Muestras del tracto respiratorio inferior	**Neumonía**
Líquido sinovial	**Artritis séptica**

Ante la duda, cualquier infección que esté causando fiebre en el enfermo ingresado en el hospital, llevará a que los médicos soliciten un hemocultivo.

Hay mayor probabilidad de obtener una bacteriemia verdadera si se hace una extracción adecuada según el tipo de infección.

En no todos los casos la extracción ha de hacerse de la misma manera. Por ejemplo, en casos de sospecha de infección grave, ha de realizarse antes

del inicio de los escalofrios. Como esto es imposible de predecir, se recomienda hacerlo lo antes posible después del comienzo de estos y la fiebre.

Si es una bacteriemia persistente, el momento de la extracción de la muestra de sangre es indiferente.

En casos de bacteriemia transitoria y de brecha, que constituyen la mayoría, la muestra de sangre ha extraerse lo más cerca del pico febril.

Es muy importante que los botes no estén contaminados con gérmenes o bacterias, tanto de los propios pacientes como de los profesionales encargados de la extracción y manipulación de la muestra y los frascos.

La manera de evitar esta contaminación por gérmenes oportunistas es:

a. Aplicando alcohol etílico desnaturado y antiséptico en la piel del paciente, en la zona donde se va a realizar la venopunción.
b. Que los profesionales usen guantes esterilizados con el fin de evitar el riesgo de contaminación.

De esta manera, la posibilidad de que aparezca un cultivo positivo por bacterias contaminantes de la piel se reduce, aumentando la probabilidad de hallar un organismo patógeno de la sangre.

Hay que extraer al menos dos muestras de hemocultivo en dos lugares distintos. Esto se hace así para descartar que haya infección o contaminación, ya que si en una de las muestras se aislan bacterias y en la otra no, se pude decir con seguridad que se está ante un microorganismo contaminante. Si en los dos cultivos se aisla el mismo microorganismo, es que se trata de un caso de bacteriemia verdadera.

Venopunción

La muestra de sangre para el hemocultivo se extrae por lo general de una vena del antebrazo. Salvo en los casos de bacteriemia relacionada con el catéter, la sangre no se debe extraer de este. Cada muestra de sangre se obtendrá de distintos lugares de venopunción.

La extracción se hace de una sola venopunción, de la cual se llenan, por lo general, dos frascos: uno aerobio y otro anaerobio.

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. Cal

Hemocultivos

Debe realizarse lo antes posible una vez aparecen la fiebre y los escalofríos, ya que las bacterias son eliminadas de nuestra sangre por la actuación de nuestro sistema reticuloendotelial en un tiempo breve. Y por supuesto, hacer la extracción antes de la administración de antimicrobianos.

Antes de llevar a cabo la extracción, hay que limpiar con un antiséptico los tapones de los frascos de hemocultivo. Para evitar que el antiséptico entre dentro de las botellas cuando se va a introducir la sangre, hay que dejarlo secar, ya que puede inhibir el crecimiento de bacterias en los frascos.

Durante la extracción, hay que evitar la contaminación debido a la flora microbiana de la piel, que por otra parte, es la causa de contaminación más frecuente y, por consiguiente, un problema a la hora de dar un diagnóstico fiable de bacteriemia. Para evitar esto, hay que limpiar la zona de la punción con alcohol etílico a 70° después de palpar la vena, y, posteriormente, aplicar solución yodada en un área circular de 2 a 4 centímetros secándola una vez aplicada para que la solución yodada realice su acción oxidante.

Una vez descontaminada la zona, hay que evitar tocarla con las manos y no hablar ni toser durante la venopunción.

No se debe usar anticoagulante para extraer la sangre.

R. RAMOS M

A. ROJAS

JEFATURA

E. GALVEZ C.

A. Galeano

Una vez que la aguja se saca de la vena, hay que inocular la sangre en el interior de los frascos, en posición vertical, empezando por el de anaerobios, procurando que no entre aire en la botella. La inoculación ha de hacerse lo más rápido posible para evitar que la sangre se coagule dentro de la jeringa. No hay que poner algodón en la aguja una vez extraída la sangre de la vena.

Una vez inoculada la sangre en el interior de las botellas, hay que moverlas, para que la sangre se mezcle con el medio de cultivo.

El número indicado de extracciones para poder documentar una bacteriemia es de 2 a 3 venopunciones, siempre en lugares distintos. Esto se hace así para poder contrastar, y comprobar si hay contaminación o bacteriemia verdadera. Por eso, al laboratorio de microbiología suelen llegar cuatro frascos de hemocultivo de un mismo paciente: 2 aerobios y 2 anaerobios. Mediante este procedimiento, logran detectarse el 95% de las bacteriemias.

Realizar una mayor número de extracciones supone un desequilibro coste/beneficio, y aumenta innecesariamente el trabajo en el laboratorio. No obstante, el aumento de extracciones está indicado para pacientes con sospecha de endocarditis sobre prótesis, ya que en ellos es difícil interpretar el aislamiento repetido de estafilococos coagulasa negativa. También se aconseja un mayor número de extracciones en enfermos con endocarditis y en los que el hemocultivo diera en un principio un resultado negativo, ya que esto se puede deber a que son microorganismos de difícil crecimiento. En estos dos casos, no solo está indicado hacer más extracciones, sino que, además, es un procedimiento bastante útil.

Como se ha indicado anteriormente, las células del sistema reticuloendotelial eliminan a las bacterias de forma rápida. Por esa razón, cuando se hace más de una extracción, hay que llevarlas a cabo de forma simultánea, y procurar no espaciar las extracciones en tiempos de varias horas.

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. GALVEZ C.
A. CE

Volumen de la extracción

El número de microorganismos en una bacteriemia suele ser muy bajo, por lo general, alrededor de 10 UFC/ml[1]. de sangre, y a veces cifras aún más bajas. Este problema se puede solucionar mediante el volumen de sangre a extraer, ya que influye a la hora de hacer el recuento de bacterias u hongos.

El volumen recomendado para cada venopunción es de 10 ml., porque si se extrae una cantidad inferior disminuye el índice de positividad. Aumentar el volumen de sangre extraída conlleva a un aumento del índice de positividad. Sin embargo, no es aconsejable sacar un volumen muy elevado, porque podría causar anemia en el paciente, además de que hay que mantener una proporción entre el medio de cultivo del frasco y la sangre inoculada.

En los neonatos y niños el número de microorganismos es más elevado que en el adulto, por lo que se pueden extraer volúmenes inferiores (pudiendo llegar incluso a 1 ml.) con garantías de obtener resultados aceptables y parecidos a los de los adultos. Sin embargo, la bacteriemia de bajo nivel es muy frecuente en los niños pequeños. Para detectarla, el volumen recomendado debe ser proporcional al volumen total de sangre del niño y a la edad. Se recomienda extraer un 4,5% del volumen total de sangre, aproximadamente.

Para anular las propiedades bactericidas de la sangre, hay que mezclar muy bien esta con el medio de cultivo que hay en el frasco, en una concentración que oscila entre el 1/5 y el 1/10. Además, esto hace que si el paciente lleva un tratamiento con antimicrobianos, estos se reduzcan, haciendo que pierdan su capacidad inhibitoria.

Una dilución pro debajo del 1/5 haría que la sangre no perdiera su capacidad bactericida, con lo que no saldría un positivo.

[1] Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Calvo

Modo de extracción

1. Levantar la lengüeta plástica de los frascos y limpiar los tapones con una gasa impregnada en solución 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.
3. 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).
4. 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 extraidos con posterioridad.
5. Se rotulará cada frasco con una etiqueta adhesiva en la que figuren el nº de historia, nombre del enfermo y el número de extracción realizada (1º, 2ª ó 3ª), teniendo la precaución de no tapar la etiqueta de código de barras del frasco.
6. Una vez llenados los frascos, se rellenará un volante por cada extracción (2 frascos), y se enviarán al laboratorio.

CAPÍTULO 3

Recepción en el laboratorio de microbiología

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Cardon

RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Transporte

Cada frasco de hemocultivo con sangre inoculada ha de esta correctamente identificado con los datos del paciente, e ir con su correspondiente volante.

Estos datos deben incluir:

- Historia clínica
- Nombre y apellidos
- Servicio
- Planta
- Número de cama

Si la extracción consiste en dos frascos, los dos han de estar identificados, con los mismos datos. Como se ha indicado anteriormente, por cada extracción ha de rellenarse un volante de petición en el que se ha de señalar si la toma es de sangre periférica o de una vía central, como por ejemplo, un catéter.

También ha de señalarse:

- Nombre del médico que lo solicita
- Diagnóstico del paciente
- Si estuviera recibiendo algún tratamiento antimicrobiano
- Tipo de análisis que se requiere: si es un cultivo convencional o un cultivo para microorganismos de crecimiento lento).

En caso de salir resultados positivos, se debe dar un número de contacto del servicio de enfermería en el que el paciente esté ingresado, o bien, el número del propio paciente en caso de que este hubiera estado en el servicio de urgencias y se le hubiese dado el alta.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Castro

Una vez que los frascos están correctamente identificados, serán transportados al laboratorio de forma inmediata. Pueden estar a temperatura ambiente, pero no por un tiempo superior a las 18 horas, puesto que puede afectar al crecimiento de los microorganismos. Lo ideal es que se conserven a temperaturas entre los 35 a los 37 º C.

Si no van a ser transportados inmediatamente al laboratorio, se deben dejar incubar en estufa, a una temperatura de 35-37º C, como ya se ha indicado, hasta que puedan ser llevados.

Si han sido incubados de forma previa a su procesamiento en sistemas automáticos, deben ser introducidos en los aparatos en un plazo de 12 horas. En caso de que se demoren por más de 18 horas, sobre todo si ya fueron incubados, puede ocurrir que los microorganismos crezcan hasta llegar a la fase estacionaria, debido a que han consumido la mayor parte de los nutrientes del medio de cultivo, por lo que no van a ser detectados por la máquina. Por eso, cando se ha pasado de este plazo de tiempo, se hace un subcultivo ciego, para evitar falsos negativos.

Los hemocultivos no deben refrigerarse nunca.

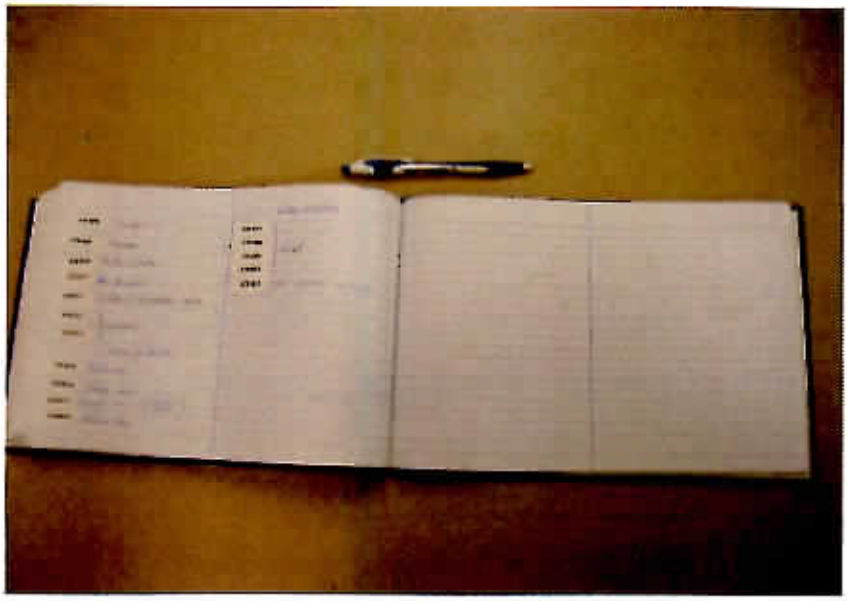
Recepción

Una vez que los hemocultivos llegan al laboratorio de microbiología, se han de realizar las siguientes comprobaciones por el profesional que los recepcione:

- Que los frascos estén íntegros, sin roturas ni fisuras
- Que estén correctamente identificados, y que los datos coincidan con los del volante de petición
- Que el volumen de sangre sea el adecuado
- Que no haya signos macroscópicos de crecimiento microbiano

Una vez comprobado que todo está correcto, se anotarán en el libro de registro del laboratorio. Hay que agrupar y ordenar los frascos por orden de extracción: 1ª, 2ª, etc.... emparejando cada frasco de aerobio con el correspondiente anaerobio.

R. RAMOS M. A. ROJAS L. LUIZ C. A. CALEO H.



Hay que asignar a cada pareja de frascos, o a uno en caso de que venga solo, un número de identificación, que también se incluirá en el volante. Si vinieran cuatro frascos (dos extracciones) del mismo paciente, hay que asignar un número de identificación diferente para cada pareja, que deberán ser correlativos.

Cuando piden micobacterias, existe un frasco de hemocultivos especial para esta determinación. Sólo viene un frasco, al que también se le asignará un número de petición.

En el caso de que no estuvieran debidamente identificados, hubiera roturas o fisuras en los frascos, o se viera algún tipo de contaminación, los hemocultivos se devolverán al servicio que envían las muestras, para que subsanen los errores, y una vez corregidos, se podrán admitir. Debido a la importancia que tienen los hemocultivos en el laboratorio de microbiología, nunca serán rechazados.

Y por supuesto, seguir siempre el protocolo de seguridad al manipular las muestras.

Una vez recepcionados los frascos, el volante se entregará al personal administrativo para su correspondiente registro en el sistema informático, mientras que las botellas se llevarán, por orden del número de identificación, al laboratorio de hemocultivos.

O. RAMOS M. A. ROJAS E. GALVEZ C. A. CARO H.

Hemocultivos

Hay que dar prioridad a los hemocultivos a la hora de trabajar en el laboratorio de microbiología, por eso se introducirán lo más rápidamente en las máquinas automáticas, evitando así el retraso en el crecimiento de los microorganismos.

CAPÍTULO 4

Procesamiento

PROCESAMIENTO

Existen dos métodos de procesamiento de los hemocultivos:

1. Manuales
   1.1. Convencional
   1.2. Bifásico
   1.3. Lisis-filtración
   1.4. Lisis-centrifugación
   1.5. Manométrico
2. Automatizados
   2.1. Radiométricos y no radiométricos
   2.2. Sistemas automáticos de monitorización continua

Aunque el procedimiento manual se sigue utilizando aún en muchos sitios, se han desarrollado nuevos métodos. Sin embargo, el concepto básico sigue siendo el mismo.

Métodos manuales

Convencional

Es un método simple que consiste en la observación macroscópica de signos de crecimiento en una pareja de frascos que contienen medios de cultivo y en los que se ha inoculado sangre del paciente.

Los medios de cultivo más utilizados son:

- Caldo triptosa soja
- Columbia
- Infusión cerebro corazón
- *Brucella*,
- Tioglicolato
- Caldo de peptona suplementado

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA

Hemocultivos

- Medios con resinas

Los frascos de hemocultivo cuentan con un anticoagulante. El que más se utiliza es el SPS (polianetol sulfonato sódico) en una concentración que va desde el 0,006 al 0,050%. Este anticoagulante se añade para reducir la capacidad bactericidas de la sangre, y favorecer el crecimiento de los microorganismos.

El medio de cultivo se inyecta al vacío en una atmósfera de CO_2. Después de esta inoculación, a uno de los frascos se le inyecta una aguja que permite el paso al interior de oxigeno atmosférico, creando asi un medio aerobio. El otro frasco no se ventila, para permitir un potencial óxido-reducción lo suficientemente bajo como para permitir el crecimiento de bacterias anaerobias.

Se incuban a 35-37° C. que es una temperatura muy cercana a la del cuerpo humano, y que demuestra un mayor aislamiento de microorganismos en un periodo breve de tiempo.

La mayoría de los microorganismos que producen bacteriemia se aislan en los hemocultivos tras un tiempo de 18 a 72 horas siguientes a su incubación. Más del 95% de los microorganismos se aislan durante la primera semana, lo que motiva que se mantenga la incubación durante 7 días.

Sin embargo, hay casos en los que se necesita más tiempo de incubación, como cuando se trata de hongos, microorganismos del género *Brucilla* y microorganismos causantes de endocarditis, como el *Cardiobacterium* o la *Eikenella*. Cuando se sospecha que pueda darse alguno de estos casos, la incubación se prolongará hasta cuatro semanas.

Los frascos han de ser observados a diario, para ver si hay signos de crecimiento bacteriano.

Estos signos pueden ser:

- Enturbamiento del medio
- Hemólisis
- Gas

R. RAMOS M
A. ROJAS
A. C

- Formación de colonias en el fondo del frasco.

El problema de la detección macroscópica es que puede dar tanto falsos positivos como falsos negativos, además de ser una técnica que produce retraso.

El medio puede quedar turbio o se puede producir hemólisis por varias causas, no solo por el crecimiento bacteriano, al igual que puede haber microorganismos que no manifiesten signos macroscópicos. Por ello, esta técnica se ha de complementar con el estudio microscópico, como la tinción de Gram.

La tinción de Gram es el estudio microscópico más utilizado, pero es lenta, por eso se sustituye en algunos sitios por la tinción con naranja de acridina, que es más rápida. Además, si se compra con la tinción de Gram, las bacterias contrastan mejor con el fondo.

Otro factor a tener en cuenta al comparar entre una tinción y otra, es que, para poder observar colonias en una tinción de Gram, es necesario que haya una concentración de 10^5 UFC/ml., mientras que en la tinción con naranja de acridina, ya se pueden observar con una concentración más baja, 10^4 UFC/ml.

Bifásico

El medio bifásico está compuesto por una base sólida y otra líquida. Si se inclina el frasco, el medio líquido cubre al sólido, realizando con ello un subcultivo, tantas veces como sea necesario sin necesidad de abrir la botella. Este método resultó eficaz para el aislamiento de la *Brucella* spp.

Con el tiempo, se han ido añadiendo modificaciones para este método, como el Septi-Check® y el Opticult®. Una vez que los frascos llegan al laboratorio con la sangre inoculada, los tapones se sustituyen por cilindros de rosca que contienen distintas superficies con distintos tipos de agar. Lo que se hace es invertir el frasco para que la sangre impregne el agar, tarea que se debe hacer a diario.

Este método es más rápido y mejor para la detección de bacterias y hongos si se comprara con el método convencional. No obstante, no es

R. RAMOS M. A. ROJAS JEFATURA A. Castro

adecuado para el cultivo de anaerobios, ya que hay que abrir la botella para adaptar el cilindro. Por eso, se complementa con otro frasco para el cultivo de anaerobios.

Lisis-filtración

Mediante este procedimiento, se filtra la sangre para retener las bacterias, una vez que se ha producido la lisis (rotura de la membrana celular) de las células sanguíneas.

Los que se siembra en los medios de cultivo es el filtro que se ha utilizado.

A pesar de ser una técnica conocida desde hace muchos años, aún no ha sido introducida al mercado. Ello es debido a que requiere tanto tiempo, que no se hace aconsejable para un trabajo rutinario.

Lisis-centrifugación

En la lisis-centrifugación, la sangre inoculada se mezcla en el interior de un tubo que contiene saponina como agente lisante, polipropilenglicol como agente antiespumante, SPS y EDTA como anticoagulantes y un líquido fluoroquímico inerte, para producir la lisis de las células sanguíneas.

Después, los microorganismos se separan de los componentes sanguíneos mediante centrifugación, a 3.000 R.P.M. durante 30 min. Una vez hecho esto, se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en los medios de cultivo.

Uno de los sistemas de lisis-centrifugación es el Isolator®. A través de él, se recupera mayor cantidad de microorganismos y con mayor rapidez que con los procedimientos convencionales. Está comprobado que es un sistema eficaz para la detección de levaduras.

Sin embargo, tiene varios inconvenientes:

- Es un sistema caro
- Laborioso
- Las muestras se han de procesar individualmente

R. RAMOS M A. ROJAS A. C

- Hay que esperar 30 minutos tras su extracción para que sean procesadas
- Conlleva un alto riesgo de contaminación de la muestra

No obstante, en algunos sitios se utiliza como sistema complementario a otros métodos, ya que permite realizar un recuento del número de colonias presentes en sangre con bastante facilidad, y hay que tener en cuenta que el recuento se está utilizando a día de hoy con mayor frecuencia a la hora de diagnosticar bacteriemia en catéteres intravasculares.

Manométrico

En el sistema manométrico, se utiliza una botella con caldo de cultivo a la que se le acopla una cámara con una aguja que llega hasta el fondo del medio líquido. Durante el crecimiento bacteriano, se produce gas, y este provoca un aumento de la presión dentro de la botella que hace que el medio de cultivo se desplace por el interior de la aguja, introduciéndose dentro de la cámara.

Si se ve que hay medio de cultivo dentro de la cámara, esto indica crecimiento bacteriano.

Se utiliza por el sistema Signal® y su principal inconveniente son los falsos positivos. No obstante, esto se puede evitar calentando los frascos.

Si se agitan los frascos durante los dos primeros días, aumenta la tasa de recuperación de microorganismos.

Sistemas automáticos

Radiométricos

Utiliza substratos marcados con C14[2]. Este, al ser metabolizado por los microorganismos, libera $14CO_2$ al medio, y de aquí, a la atmósfera del frasco. Para medir los niveles de $14CO_2$, hay que compararlos con unos frascos de control que contienen CO2.

[2] Carbono 14

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
K. ALVEZ C.
A. CERON

Se hace mediante el sistema Bactec 460® radiométrico, y la lectura se lleva a cabo a través de una cabeza móvil automatizada de dos agujas que perforan los tapones de goma de los frascos.

El mayor inconveniente deriva del manejo y eliminación de los residuos radiactivos.

En la actualidad han surgido sistemas mejorados, de manera que ha quedado para el cultivo de micobacterias.

No radiométricos

Son sistemas muy parecidos a los radiométricos, sólo que detectan los niveles de CO_2 por espectrometría de infrarrojos, mediante el Bactec NR-660® y el NR-730®.

Para los frascos anaerobios, usan un agitador durante las primeras 24-48 horas.

Para los aerobios, se recomienda hacer dos lecturas durante los primeros tres días, y, a partir de ahí, una lectura diaria hasta que lleguen a los 5 ó 7 días.

Tanto los sistemas radiométricos como los no radiométricos han sido desplazados por los de monitorización continua.

Sistemas automáticos de monitorización continua

Hoy en día, se han introducido en el mercado sistemas que realizan agitación y monitorización continua de los frascos, informando de forma inmediata los resultados positivos, y utilizando técnicas en general que no son invasivas para la lectura y en las que no hay manipulación, minimizando el riesgo de contaminación de las muestras.

Los más empleados basan su técnica en la lectura del CO_2 que producen los microorganismos. Los datos obtenidos de cada lectura se transmiten a un ordenador, donde son almacenados y procesados. En el momento en el que se produce el crecimiento bacteriano, el ordenador lo detecta, dando un resultado. Es un procedimiento efectivo y fiable, ya que

R. RAMOS M A. ROJAS

minimiza los riesgos de dar lecturas tanto de falsos positivos como de falsos negativos.

Cada sistema automático de monitorización continua puede diferir con respecto a otro en el método de detección del CO_2, 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.

El BacT/Alert® fue el primer sistema en emplear una técnica de agitación y monitorización continua de cada frasco que no resultaba invasiva. Se basa en la detección tanto del aumento como del nivel total del CO_2 producido por el crecimiento microbiano. Tal detección la hace a través de un sensor colorimétrico que está pegado al fondo de los frascos. A medida que cambia el color del sensor, la cantidad de luz se incrementa, aumentando el voltaje. Estas señales se transmiten a un ordenador, el cual las procesa mediante tres criterios. Estos manifestarán si hay crecimiento.

La lectura se realiza cada 10 minutos.

El Bactec-9240® está compuesto por un incubador, un detector y un ordenador. En el fondo del frasco de hemocultivo hay un material fluorescente que reacciona con el CO_2 producido por los microorganismos, haciendo que cambie la luz. Este cambio es detectado por un fotosensor. Estos miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO_2 producido por los microorganismos. Esta medida se transmite al sistema, el cual la interpretará de acuerdo a unos parámetros programados.

La lectura se hace cada 10 minutos, y un sistema luminoso avisará de la presencia de frascos positivos después de cada lectura.

El Vital® es otro sistema no invasivo que se diferencia de los dos anteriores en que cuenta con un indicador fluorescente en el propio medio de cultivo. La fluorescencia disminuye cuando el metabolismo microbiano produce cambios en el pH, en el potencial redox[3] o en el nivel de CO2.

La lectura se hace cada 15 minutos por medio de un detector luminiscente.

[3] Óxido-reducción

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
A. O

Hemocultivos

El inconveniente de este sistema está en su dificultad para la lectura de las levaduras.

En el sistema ESP®, los frascos se colocan en cajones. Sólo se agitan los frascos de aerobios, los de anaerobios no. Se basa en la detección tanto de la producción como del consumo de gas.

Hace una lectura cada 12 minutos.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ C.

A. CUTRO H.

CAPÍTULO 5

Cultivo

CULTIVO

Procedimiento

Una vez que el sistema señala que hay hemocultivos positivos, hay que proceder al cultivo en placas.

Si se está utilizando un sistema automatizado de monitorización continua, se ha de imprimir un informe en el que aparezcan los hemocultivos positivos ordenados por número de identificación, y se buscará el volante correspondiente para anotar los resultados, la posición que ocupaban en el sistema, la fecha, y mirar si piden hongos o alguna técnica en especial. Una vez localizados los volantes y anotado esto, los informes de los frascos positivos se archivarán.

Los hemocultivos señalados como negativos por el sistema, se podrán sacar, pero habrá que esperar verificación del facultativo para ser desechados. Al igual que con los positivos, se imprime un informe donde constan los hemocultivos que han dado negativo, pero para estos, no hace falta localizar los volantes para anotar los resultados en ellos.

Muy importante, cada vez que se impriman los informes de positivos y negativos, verificar que los números y la posición coinciden con los números y la posición que ocupan los frascos a sacar.

Medios de cultivo

Una vez comprobado si piden hongos, y anotados los resultados y posición que ocupaban en el sistema en los correspondientes volantes, los frascos positivos se colocarán en la campana de seguridad biológica para llevar a cabo el cultivo en placas.

Las placas a utilizar son:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar MacConkey
- Agar Brucella, para incubar en anaerobiosis
- Agar Sabouraud, en caso de que pidan hongos

Este cultivo se complementará con una tinción de Gram

En algunos sitios, el protocolo indica usar dos placas de agar sangre: una para incubar en aerobiosis y otra para anaerobiosis, en vez de utilizar la placa de agar Brucella. En ese caso, hay que señalar cuál de las dos placas de agar sangre se incuba en anaerobiosis.

Placa de Sabouraud

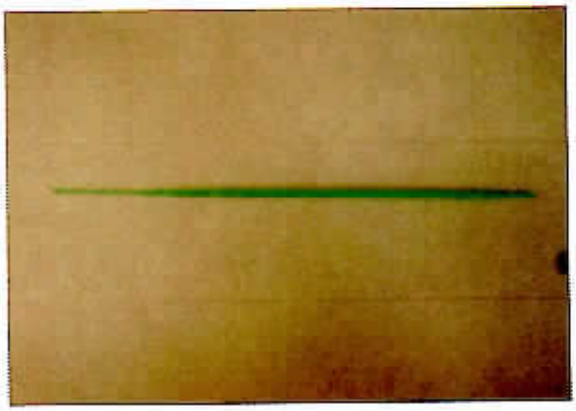
Placa de Brucella

Cada placa y el portaobjetos para realizar la extensión se identificarán con el número de identificación de la botella correspondiente. Hay que tener en cuenta que sólo se cultivará hongos del frasco de aerobios.

Una vez rotuladas las placas, se pincha un adaptador en el tapón de goma del frasco del que se va a cultivar, dejando caer dos gotas de la sangre inoculada en cada una de las placas y una en el portaobjetos en el que se hará la extensión para la tinción de Gram.

A partir del cuadrante donde se han descargado las gotas de sangre, se hace la siembra por estriación con un asa de 1 µl. Se siembra haciendo estrías sobre la superficie del medio que contiene la placa, repitiendo el proceso cuatro veces hasta obtener cuatro grupos de estrías, para que la muestra se diluya y los microorganismos que contiene queden aislados.

En el portaobjetos, hay que realizar una extensión fina a partir de la gota de sangre, dejando secar a temperatura ambiente y fijándola por calor antes de llevar a cabo la tinción.



Una vez se han sembrado todas las placas, se incuban siguiendo el protocolo que aparece a continuación

Agar sangre	**37° C**	**Aerobiosis**	**48-72 horas**
Agar sangre	**37° C**	**Anaerobiosis**	**48-72 horas**
Agar chocolate	**37° C**	**CO_2**	**48-72 horas**
Agar MacConkey	**37° C**	**Aerobiosis**	**48-72 horas**
Agar Sabouraud	**30° C**	**Aerobiosis**	**5-7 días**
Agar Brucella	**37° C**	**Aerobiosis**	**3-5 días**
Agar Brucella	**37° C**	**CO_2**	**3-5 días**

Informe preliminar

Un resultado positivo en un hemocultivo que se comunique a tiempo, puede ser significativo ya que puede ahorrar costes clínicos y encontrar una solución rápida para la enfermedad del paciente e incluso salvar su vida.

Por eso, en cuanto se hace la lectura en microscopio de la tinción de Gram, y se observan microorganismos causantes de bacteriemia, hay que comunicar lo antes posible los resultados al médico responsable del enfermo.

En el informe que se pasa al médico, tiene que constar la morfología de los microorganismos, el resultado de la tinción de Gram, el número de hemocultivos en los que se observan en comparación al total de los extraidos y la fecha de obtención de los mismos.

CAPÍTULO 6

Lectura

LECTURA

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del cultivo en placas, el facultativo hará lectura de cada una de ellas.

Antes, hay que preparar la mesa, ordenando las placas incubadas por orden de identificación y por atmósfera. También se sacarán los antibiogramas y pruebas del día anterior.

Una vez realizada la lectura, se llevarán a cabo los pases, pruebas y antibiogramas pertinentes.

Resultados

No todos los hemocultivos positivos presentan bacteriemia verdadera, ya que la sangre puede estar contaminada por otros gérmenes que no son los que causan infección. Un ejemplo serían los gérmenes que hay en la piel del enfermo, o los que forman colonias en el catéter o la cánula.

También pueden pasar de las manos del profesional que extrae la sangre. Incluso en el laboratorio de microbiología, al manipular las muestras, puede haber contaminación.

Por eso es tan importante una correcta extracción, transporte y manipulación de estas.

Se debe distinguir la bacteriemia verdadera, que es la producida por microorganismos que causan infección en la sangre del paciente, de la falsa bacteriemia, que es la que se produce por contaminación de las muestras.

R. RAMOS M.
A. ROJAS
JEFATURA
K. GALVEZ C.
A. C.

Bacteriemia verdadera

La bacteriemia verdadera va a estar causada entre otras, en el 90% de los casos, por:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli* y otras enterobacterias
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Streptococcus pneumoniae*

Falsa bacteriemia

Son microorganismos contaminantes los siguientes:

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

Estos, se considerarán contaminantes si sólo se dieran en un hemocultivo. Si aparecen en dos o más, pueden causar bacteriemia significativa.

No obstante, valorar la cantidad de hemocultivos positivos no es siempre prueba de bacteriemia verdadera, ya que la mayoría de estás suelen ser transitorias, dando un porcentaje del 70-80% de casos en los que el hemocultivo es positivo. Por ello, hay que contrastar con otras pruebas complementarias, como localizar algún foco infeccioso o averiguar si hay cuerpos extraños. También es importante a la hora de dar resultados fiables, que haya comunicación entre el clínico y el microbiólogo, para contrastar datos y que la información sea lo más completa y cercana a la realidad posible.

Tras el crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo se identificarán y se realizarán pruebas de sensibilidad que señale el protocolo. Los microorganismos considerados como contaminantes se identificarán sólo al nivel de género. 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.

Pruebas

El principio de las pruebas se basa en el estudio del crecimiento de los microorganismos en situaciones específicas o presencia de antibióticos de antibióticos, así como de la reacción de estos frente a determinadas sustancias.

Hay que tener en cuenta que, al sembrar la sangre inoculada en un medio de cultivo, y una vez transcurrido el período de incubación, pueden crecer colonias de distintas especies de microorganismos. Esto es porque, en algunos medios, crece todo.

Hay distintos medios de cultivo:

Medios de enriquecimiento: sirven para que los microorganismos aumenten en número, si se piensa que se tienen colonias pobres. Estos medios inhiben el crecimiento de otros microorganismos acompañantes.

Medios de aislamiento: para aislar a una sola colonia con todas sus propiedades.

Medios selectivos: poseen componentes que permiten o no el crecimiento de determinados microorganismos.

Diferenciales: están compuestos por sustancias que varían de color dependiendo de la colonia sembrada.

Sin embargo, es posible que, para el microbiólogo, sólo resulte de interés uno o dos tipos de colonias. Es por eso que, una vez leídas las placas, se solicite un aislamiento de las colonias que se quieren estudiar.

Por otro lado, y como ya se ha indicado, algunas colonias estarán formadas por microorganismos que causen bacteriemia verdadera, mientras

R. RAMOS M A. ROJAS JEFATURA E.GALVEZ A. C

que otras no. Sólo de un tipo de colonias se querrá averiguar su sensibilidad a los antibióticos.

La finalidad del aislamiento es la separación de las colonias, obteniendo así las de interés para ser estudiadas.

Informe definitivo

Una vez que se hacen los pases, pruebas y antibiogramas necesarios, estos se volverán a incubar. Por lo general, el tiempo de incubación será de 24 horas, aunque hay algunas pruebas en las que la lectura se puede realizar al cabo de unas horas.

Una vez que transcurra el tiempo de incubación necesario, se hará lectura de los pases y pruebas, para tener una idea más exacta del tipo de microorganismo causante de la bacteriemia.

Debe informarse, en cuanto se disponga de ella, la sensibilidad del microorganismo a los antimicrobianos según el antibiograma inicial.

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
Calero H.

CAPÍTULO 7

Pruebas de sensibilidad

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Castro H.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Una de las pruebas más importantes del laboratorio de microbiología es la detección de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. Esto se lleva a cabo mediante los antibiogramas, que indicarán la respuesta de una colonia a determinado antimicrobiano, y por tanto, indicar el tratamiento que ha de seguir el paciente.

Hay que tener en cuenta que el antibiograma define la actividad de un antibiótico frente a una bacteria in vitro, así como su capacidad para inhibir su crecimiento. Sin embargo, el resultado que nos de, no es lo único que hay que tener en cuenta a la hora de administrar un tratamiento al paciente. Estos resultados se han de complementar con otros datos:

- Farmacologia del antibiótico
- Tipo de enfermedad que sufre el paciente
- Clinica del paciente
- Posibles causas de la infección

Es importante realiza el antibiograma incluso en los casos en los que se conoce que no hay mecanismos de resistencia. Esto es asi porque se sabe que los microorganismos pueden cambiar, y volverse resistentes.

Cada laboratorio seguirá su protocolo en cuestiones de pruebas de sensibilidad.

Tipos de pruebas

Antibiograma disco-placa

Es una prueba de sensibilidad recomendada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

El método sería el siguiente: tocar con un asa de 1 µl tres colonias diferentes y aisladas. Inocular 0,5 McFarland de estas colonias en una solución de suero salino. Impregnar una torunda con el inóculo, y sembrar en agar en placa de petri (suele usarse Agar Mueller-Hinton, pero dependiendo del

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
Calero H.

laboratorio podrá usarse Agar Mueller-Hinton Sangre), cubriendo toda la superficie de la misma.

Debe asegurase que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm. del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm. no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm. no más de 6.

Una vez sembrada, depositar en la superficie del medio de cultivo unos discos impregnados con los diferentes antibióticos con pinzas estériles.

Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración.

Una vez depositados los discos necesarios, la placa se debe incubar en posición invertida (con los discos bocabajo) entre 18-24 horas a 35° C en atmósfera aeróbica. Transcurrido ese tiempo, se podrá ver que alrededor de los

R. RAMOS M

A. ROJAS

discos hay una zona en la que no se ha producido crecimiento bacteriano. Se puede decir entonces que ha sensibilidad frente al antibiótico en cuestión.

Si hay crecimiento de colonias donde se ha depositado el disco, entonces el microorganismo es resistente.

Después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con una regla. Si el microorganismo es un estafilococo o un enterococo hay que esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad a la oxacilina y vancomicina. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre sobre la superficie del agar. En las pruebas de sensibilidad a meticilina en estafilococos el halo alrededor de la oxacilina debe observarse utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa, a excepción de estafilococos resistentes a oxacilina o enterococos resistentes a vancomicina. La interpretación de los resultados puede realizarse en función de las normas del NCCLS.

Comparando los diámetros del halo de inhibición con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs), se han fijado unos criterios para clasificar las cepas estudiadas. De esta forma se han fijado tres categorías: sensible, intermedia y resistentes. Anteriormente se añadía la categoría moderadamente sensible (MS) que tiende a eliminarse y los resultados correspondientes a la misma se han situado en la categoría de intermedia. Las interpretaciones seguirán las normas establecidas por el NCCLS pero, por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm. es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm. son los que presentan las cepas resistentes.

R. RAMOS M

A. ROJAS

E. SALVEZ C.

A. Calero H

El término sensible indica que la infección ocasionada por la cepa puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, teniendo en cuenta el tipo de infección y de la especie bacteriana.

El término intermedio indica que el halo de inhibición se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre o tejidos y que puede esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano (p. ej., en la orina) o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual. El NCCLS también incluye en esta categoría aquellos casos de antimicrobianos con márgenes de toxicidad estrechos en los que pequeños errores técnicos podrían suponer cambios de interpretación en la categoría clínica.

Finalmente, el término resistente se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

Método el Epsion-Test (E-Test)

En este método se utilizan tiras, en vez de discos. Son de plástico no poroso e incorporan un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. Miden 6 cm. de largo por 5 mm. de ancho.

El procedimiento de preparación de inóculo y siembra es el mismo que para el método de disco.

Una vez sembrado el microorganismo en la placa de Agar Mueller-Hinton, se depositarán las tiras de E-Test en la superficie del medio de cultivo, utilizando pinzas estériles, y procurando no dejar burbujas de aire entre la tira y el medio de cultivo. Nos debemos asegurar que la escala de CMI está orientada hacia arriba y que la concentración máxima está cercana al extremo de la placa de petri.

A diferencia de la colocación de discos, que da igual qué cara del mismo pongamos en contacto con la superficie del agar, las tiras de E-Test tienen que

R. RAMOS H.

A. ROJAS

depositarse por uno de sus lados, ya que el gradiente de concentraciones se sitúa solo sobre una de las caras de la tira.

Hay que tener cuidado en no mover las tiras una vez depositadas en la superficie del medio, ya que el antibiótico empieza a hacer efecto rápidamente.

Cuando se utiliza una placa de petri de 100 mm. depositar solo una tira por placa y poner la tira en el centro de la placa, aunque en algunos laboratorios el protocolo permite que se depositen un máximo de dos, una en cada mitad de la placa. Cuando se utiliza una placa de 150 mm. no se deben colocar más de 6 tiras y siempre en una disposición en forma de los radios de una rueda.

Una vez colocadas las tiras, se incuba a una temperatura y atmósfera óptimas para el crecimiento del microorganismo a estudiar.

Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

Después del período de incubación, leer la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test.

Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CMI se informará como superior al valor máximo de la escala de lectura y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe ser informado como inferior al valor mínimo de la escala de lectura. Con ciertas combinaciones de bacterias-antibióticos, el extremo de la elipse de inhibición puede ser difuso.

Cuando la CMI coincide entre dos marcas de la tira se informará el resultado correspondiente al valor superior.

Si se observan intersecciones diferentes del crecimiento bacteriano en ambas partes de la tira, debemos informar el valor de CMI más alto si la diferencia entre los dos valores no es superior a la mitad de un paso de dilución doble. Por ejemplo, si la CMI en un lado de la tira es 8 y en el otro es 12, deberemos informar 12. Sin embargo, si en un lado es 8 y en otro lado 16 debemos repetir la determinación.

El E-test se ha utilizado para determinar la CMI de diversos antibióticos en una amplia gama de bacterias, incluyendo *Helicobacter pylori, Corynebacterium* spp., estreptococos nutricionalmente deficientes y enterococos con resistencia elevada a aminoglicósidos. En algunos casos como vancomicina y *S. pneumoniae,* el E-Test da un CMI más elevado si se compara con otros métodos.

El E-test se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI.

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. GALVEZ G.

A. Calero H.

Métodos de dilución

Estos métodos se basan en determinar el crecimiento de los microorganismos cuando se encuentran en un medio de cultivo en el que hay diluido un antimicrobiano. Estas técnicas valoran tanto la capacidad de inhibición como las propiedades bactericidas del antimicrobiano.

En las primeras pruebas, se utilizaban tubos con caldo de cultivo en el que había una rango determinado de antimicrobianos (macrodilución), pero eran técnicas engorrosas por la cantidad de materiales y de manipulaciones para llevarlas a cabo.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo.

En la actualidad, se suelen usar métodos automatizados de microdilución en caldo adaptables a los sistemas automáticos de lectura e interpretación de resultados, sistemas que se encuentran en muchos laboratorios, pero su principal inconveniente es el coste.

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y se incuba para que tenga lugar el crecimiento del microorganismo. Después, se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos de dilución son útiles cuando se quiere averiguar tanto la capacidad inhibitoria del antimicrobiano como su capacidad bactericida. No obstante, hay que complementar los resultados con otra información si se quieren obtener datos más fiables, como por ejemplo, variables que van en función del tipo de microorganismo, del medio de cultivo o del inóculo.

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
A. Calero H

Si se comparan con los métodos de difusión, los de dilución son más complejos y más caros, sobre todo cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

Existen dos medios de dilución:

- Dilución en agar
- Dilución en caldo

Dilución en agar.

El antimicrobiano se incorpora a un medio con agar, cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo, que permite inocular entre 32 y 36 organismos.

Los replicadores suelen dispensar gotas con un volumen de 1 a 2 µl. El inóculo que debe contener cada una de estas gotas ha de tener una turbidez de 0,5 McFarland, para asegurar que en cada una de ellas haya una concentración mínima de 10^4 UFC.

Una vez preparado el inóculo, se pondrá una alícuota de cada uno de los inóculos en los correspondientes pocillos del replicador. Para la inoculación se deben preparar las series de placas de modo que se comience inoculando un control sin antimicrobiano, se continúa inoculando a partir de la placa con menor concentración de antimicrobiano y se finaliza sembrando una nueva placa de control sin antimicrobiano. Cada uno de los inóculos se debe sembrar en aislamiento en una placa sin antimicrobiano para comprobar posteriormente la pureza de los mismos, y si fuera necesario disponer de un cultivo fresco tras la correspondiente incubación.

Las placas inoculadas se dejarán a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estén secas. Posteriormente se incuban a 35° C durante 16 a 20 horas y se procede a su lectura. La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo). Ocasionalmente pueden verse algunas colonias o

R. RAMOS M.

A. ROJAS

franco crecimiento en concentraciones superiores a la CMI aparente; en estos casos se debe comprobar la pureza del inóculo para descartar una contaminación; si esta última se confirma deberá repetirse el estudio.

Dilución en caldo

Se suele utilizar caldo Mueller-Hinton (lo recomienda el NCCLS) al que se le añadirán los componentes necesarios para el crecimiento bacteriano.

Existen dos métodos de dilución en caldo:

- En tubo o macrométodo
- En placas de microtitulación (micrométodo)

Macrométodo

Se emplea, por cada combinación microorganismo/antimicrobiano, una batería de tubos. Lo normal es que se prepare la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml. de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar, teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml. de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad.

Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml. al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml.

Es muy importante que, para cada paso de dilución, se debe emplear una pipeta diferente.

La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml. de caldo.

Micrométodo

Se utiliza una placa con pocillos, también llamados paneles, basados en el uso de sistemas semiautomáticos de incubación-lectura-interpretación. Esto

R. RAMOS M

A. ROJAS

V.º B.º JEFATURA

A. Calero H

le da la ventaja de tener un uso fácil, pero como contrapartida, más gasto que si se compara con otros métodos.

Algunas compañías han introducido en el mercado paneles en los que el medio de cultivo incluye un indicador fluorescente que permite la obtención rápida (menos de 8 horas) de los resultados; sin embargo, no existen aún datos suficientes que permitan aconsejar el uso rutinario de este tipo de paneles. Varias compañías comerciales están evaluando, también, sistemas expertos (programas informáticos) que facilitan la interpretación clínica de los resultados obtenidos; es presumible que su uso se generalizará en un futuro.

No obstante, aquí se hará mención a las placas preparadas en el laboratorio.

La mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8), de las cuales, la última columna se suele utilizar como control de crecimiento, estudiándose 8 antimicrobianos y 11 diluciones para el mismo microorganismo, aunque a veces se preparan placas con 12 diluciones de antimicrobiano y se utiliza una placa adicional para realizar los controles.

El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100 µl., por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 µl. de caldo

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA

con antimicrobiano y un volumen inferior a 10 µl. de inóculo; o 50 µl. de antimicrobiano si es que se va a añadir otros 50 µl. del inóculo. En este último caso debe tenerse en cuenta, a la hora de calcular la concentración inicial más alta, que tras añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad.

Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una pipeta multicanal con 100 ó 200µl. de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1. Posteriormente se añade un volumen de 50 o 100µl. de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 2 a 11 y se realiza la dilución en la forma habitual empleando la pipeta multicanal, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano- y negativos - no inóculo-).

Antes de inocular, hay que preparar una suspensión con la colonia a una turbidez de 0,5 McFarland, para conseguir un inóculo final en cada pocillo de 5 x 10^5 CFU/ml., ó 5 x 10^4 CFU para la técnica de micrométodo.

Para la técnica de macrométodo se hará una dilución 1:100 de forma que al añadir 1 ml. a los tubos con 1 ml. de medio con antimicrobiano queden 10^6 CFU en 2 ml., lo que equivale a 5 x10^5 CFU/ml.

Los tubos o placas se incubarán a 35º C durante 16 a 20 horas. Hay que tener cuidado en no apilar las placas en grupos de más de 5 ó 4, para evitar diferencias de temperatura durante la incubación.

Otras técnicas de micro o macrométodo pueden requerir otros tiempos de incubación diferentes a los arriba señalados.

Tras la incubación, se procede a la lectura. La interpretación de los resultados, que a veces resulta compleja, se facilita tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos o pocillos usados como control positivo. En el caso de las placas de micrométodo dichos controles positivos deben presentar una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm. de diámetro. Para observar el crecimiento de los pocillos, a veces resulta necesario limpiar la parte inferior de la placa de microtitulación, lo que puede realizarse con papel absorbente. La lectura es más sencilla utilizando un lector con espejo en el que se refleja la parte inferior de la placa de microtitulación.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

A. Galero H.

Hemocultivos

En general, los valores de CMI obtenidos mediante micrométodo son iguales o una dilución menor a los que se obtienen por macrométodo.

CAPÍTULO 8

Tinción de Gram

TINCIÓN DE GRAM

Es una tinción que se utiliza para clasificar a las bacterias en base a una serie de características:

- Forma
- Tamaño
- Morfología celular
- Reacción a la tinción (color que va a adquirir la bacteria)

Toma el nombre de Christiam Gram, bacteriólogo danés que la ideó.

Lo que hace es diferenciar a las células entre Gram+ o Gram-, dependiendo del color que adquieran tras la tinción, y esto es así en función de las características de la pared celular. Algunas bacterias, debido a esta razón, no se llegan a teñir.

Es una técnica muy útil en el laboratorio, ya que sirve para dar un diagnóstico rápido del tipo de microorganismo que está causando la infección, aunque no se debe olvidar que no se trata de una prueba que de un resultado definitivo.

Procedimiento

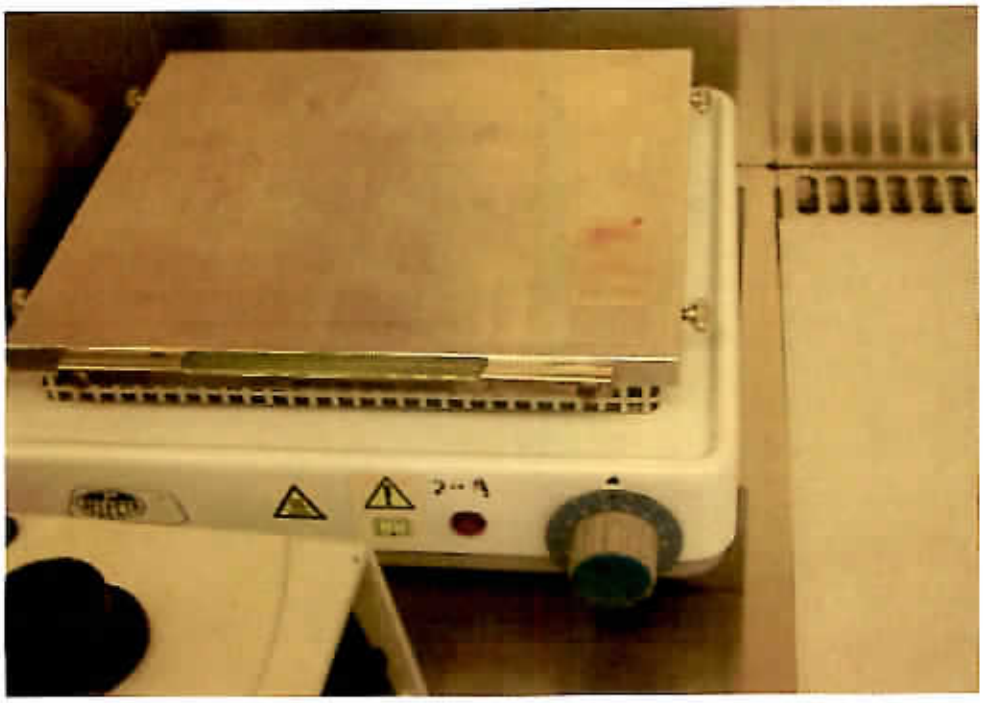
Hacer una extensión fina y bien diseminada de la muestra por la superficie del portaobjetos. Si la extensión es fina, se evita el solapamiento de las células.

R. RAMOS M

A. ROJAS

Hay que tener cuidado de que este esté bien limpio, que en su superficie no hayan partículas de polvo o grasa. Para evitar esto, en algunos laboratorios dejan los portaobjetos en un recipiente con alcohol. Poco antes de ser utilizados, se sacan para dejarlos secar.

Una vez hecha la extensión, se fija mediante calor. El portaobjetos se pasa entre 2-3 veces por la llama con cuidado de no quemar la extensión. Después, se deja enfriar un rato antes de pasar a la tinción.

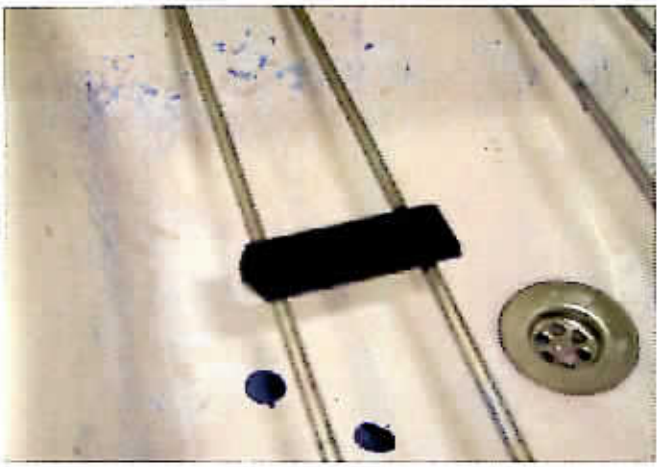


En algunos sitios utilizan metanol para la fijación. Este método es útil cuando se quiere evitar la lisis de los hematíes y el posible arrastre de la extensión de algunas muestras, como orina o líquidos cuando se hace el paso del lavado de la extensión. Otra ventaja es que, al microscopio, se puede ver un fono más claro que con la fijación por calor. Consiste en secar la extensión al aire, añadir unas gotas de metanol sobre ésta durante 1 minuto, decantándolo sin lavado y dejando secar la extensión otra vez al aire. Debido a que el metanol es un tipo de alcohol, hay que evitar el uso de calor.

Para la tinción, el uso de colorantes, tiempos, etc., pueden variar si se trata de un laboratorio u otro. Teniendo en cuenta estas diferencias, y tras dejar

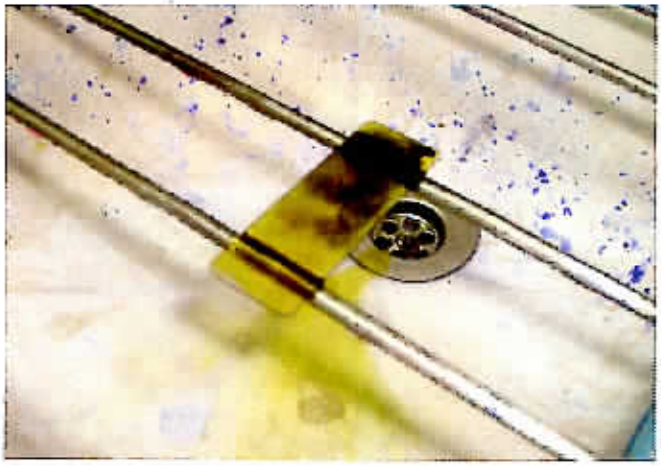
pasar el tiempo necesario una vez fijada la muestra, los pasos durante la tinción son los siguientes:

1. Cubrir el portaobjetos con Cristal de Violeta durante 2 minutos

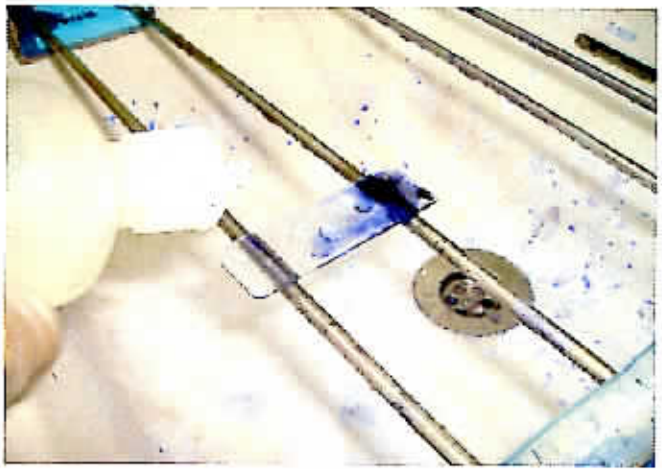


2. Lavar con agua

3. Fijar con lugol durante 20 segundos

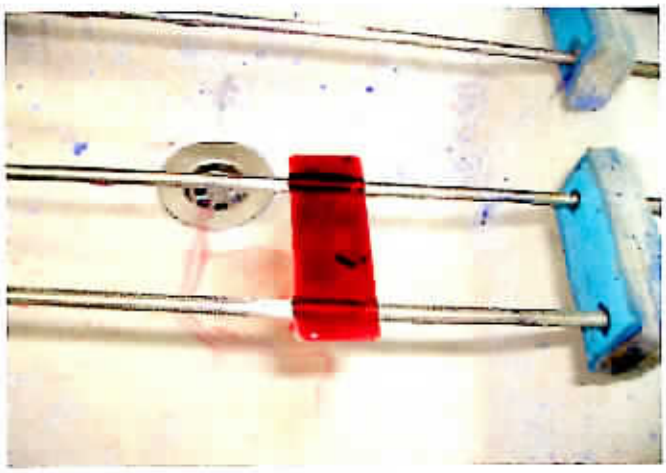


4. Lavar con agua
5. Decolorar con alcohol acetona durante 20 segundos



6. Lavar con agua

7. Teñir con safranina durante 2 minutos



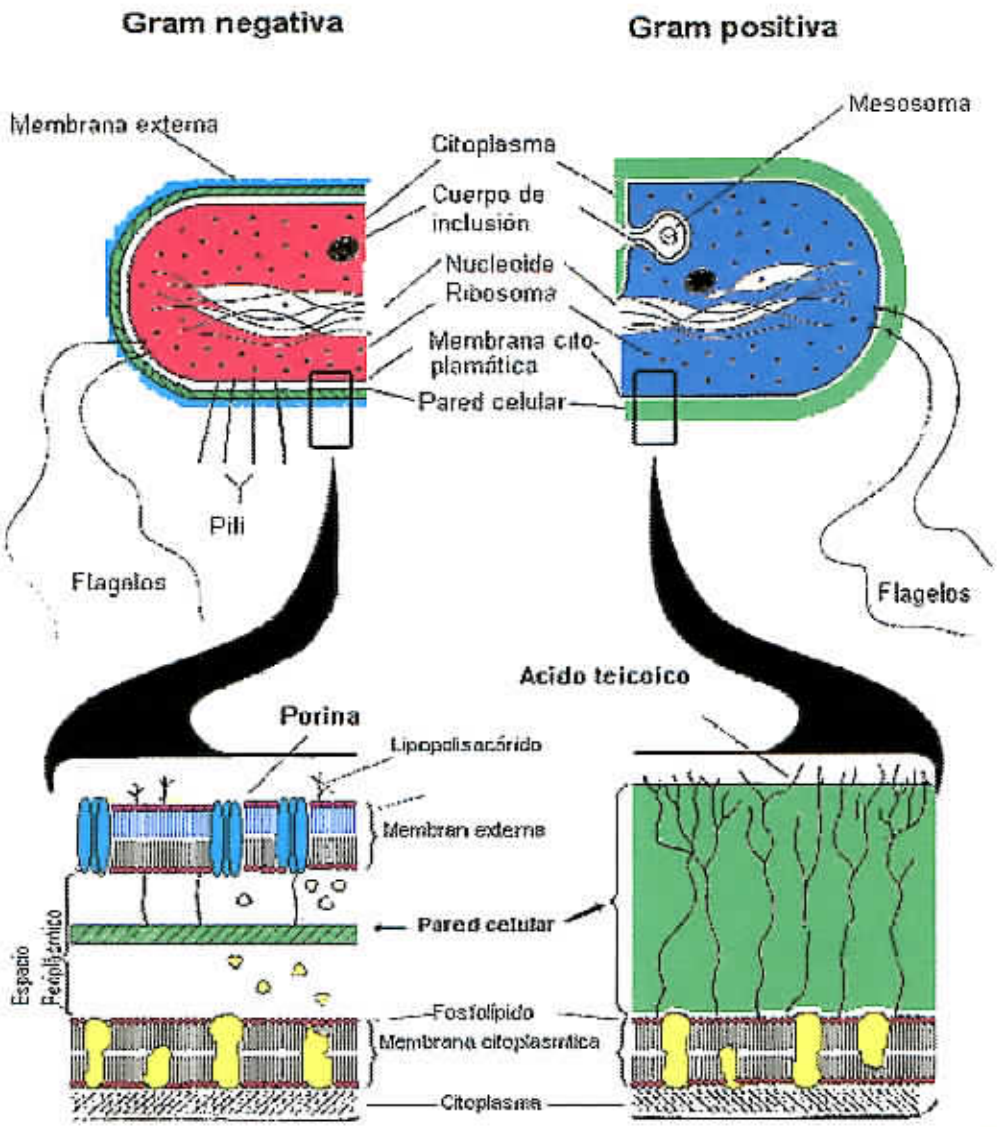
8. Lavar con agua y dejar secar

En algunos sitios, en vez de safranina, se puede emplear fucsina.

Resultados

Gram+

Las células adquieren un color de violeta fuerte a azul claro. Las bacterias gram (+) tienen una gruesa capa de péptidoglucano y gran cantidad de ácidos teicóicos que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona, reteniendo el colorante inicial fijado con el yodo del lugol y visualizándose en distintos grados de tonos desde el violeta al azul claro, dependiendo de si la naturaleza de su pared celular está intacta o dañada (por tratamientos antibióticos, edad celular…).



Gram-

Toman una coloración rosa o roja. Estas células tienen en su pared celular una delgada capa de peptidoglucano ligada a una membrana externa por moléculas de lipopolisacáridos. Esta membrana externa es dañada por el alcohol acetona de la decoloración, permitiendo que el primer colorante fijado con yodo escape y sea reemplazado por el contracolorante (safranina o fuscina).

Cuando se ven al microscopio microorganismos parcialmente positivos y negativos, puede ser debido a una mala extensión, fijación o tinción, presencia de células viejas, daño en la pared celular o por particularidades especiales de

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Calero H.

la pared celular de ciertos microorganismos. A veces, también pueden aparecer células que no se tiñen, aunque el fondo adquiere un ligero Gram-. Esta reacción gram ha sido vista en tinciones de muestras clínicas en donde están presentes elementos fúngicos o algunas especies de micobacterias.

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. 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.

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(*Neisseria*)
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 (*Haemophilus*)
Levaduras		Agar Saboureaud+cloranfenicol, agar Saboureaud+cloranfenicol+cicloheximida
Flora mixta	Gram (+) y Gram (-)	Agar sangre+ácido nalidíxico, agar MacConkey

R. RAMOS M

A. ROJAS

K. SALVEZ G.

A. Calero H

CAPÍTULO 9

Pruebas de determinación

PRUEBAS DE DETERMINACIÓN

Prueba de la oxidasa

La prueba de oxidasa es una prueba usada en microbiología para determinar si una bacteria produce alguna de las citocromo c oxidasas, enzimas que se encuentran en las capas lipídicas de las bacterias y en las mitocondrias, cuya función es el transporte de electrones.

La prueba hace uso de discos impregnados con un reactivo que también es un indicador redox.

El reactivo pasa de azul oscuro a granate al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido.

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para:

- Identificar todas las especies de *Neisseria*
- Diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

Realización de la prueba:

Método en placa directa

- Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.
- Observar los cambios de color. Dependiendo del reactivo que se utilice, el tiempo de espera puede variar, de 10-15 segundos hasta 10-30 minutos.

Método en papel

- Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri.
- Agregar 2-3 gotas del reactivo en el centro del papel.
- Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.
- La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

Oxidasa positiva:

Significa que la bacteria sí posee citocromo c oxidasa, por lo que puede usar oxigeno en la producción de energía con una cadena de transporte de electrones. Un ejemplo seria el género Neisseria.

Oxidasa negativa:

El que no la posea significa que no puede usar el oxigeno en la cadena de transferencia de electrones o aplican un citocromo diferente para transferir electrones al oxigeno. Es una característica de las enterobacterias

Prueba de la catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

- *Streptococcus* (catalasa-) de *Micrococcus* y/o *Staphylococcus* (catalasa+).
- *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-).
- *Lysteria monocytogenes* y/o *Corynebacterium* (ambos +) de *Erysipelothrix* (-).

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo dos técnicas:

Método con portaobjetos

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de agua oxigenada al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

R. RAMOS M. A. ROJAS K. GALVEZ C. A. Cajero Ff.

- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

Método con tubo de ensayo

- Agregar 1ml. de agua oxigenada al 3% directamente a un cultivo puro de agar inoculado en un tubo de ensayo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Si el inóculo se toma de una colonia sembrada en agar sangre, hay que tener cuidado de no arrastrar parte del agar, ya que los eritrocitos que forman el medio de cultivo contienen catalasa y su presencia dará un falso resultado positivo.

Prueba de aglutinación en látex

Es un método rápido, de laboratorio, para examinar ciertos anticuerpos o antígenos en una variedad de fluidos corporales, como la saliva, la orina, el líquido cefalorraquídeo o la sangre. Es el resultado de la reacción entre un anticuerpo y una partícula antigénica (que en este caso se halla en las gotas de látex). En este proceso, el anticuerpo se denomina aglutinina, y el antígeno aglutinógeno.

La prueba depende de qué tipo de muestra se necesite, si es orina, sangre o líquido cefalorraquídeo.

La muestra se mezcla con gotas de látex cubiertas con un anticuerpo o un antígeno específico. Si la sustancia sospechosa está presente, las gotas de látex se agruparán. Por ejemplo, si el médico sospecha que el niño tiene faringitis estreptocócica, se toma una muestra faríngea y se mezcla con las gotas de látex cubiertas con anticuerpos contra la bacteria. Si el niño tiene faringitis estreptocócica, la bacteria en la muestra reaccionará con los anticuerpos en las partículas de látex, ocasionando la aglutinación.

No se considera una prueba determinante para el diagnóstico, por lo que es una prueba complementaria.

Para asegurar resultados más precisos, es posible que el médico aconseje no tomar determinados alimentos antes de realizar la prueba.

R. RAMOS M
A. ROJAS
JEFATURA
A. Castro H

Betalactamasa de espectro extendido (BLEE)

La betalactamasa es una enzima producida por algunas bacterias, responsable de la resistencia de estas ante determinados antibióticos betalactámicos, como la penicilina. Estos antibióticos tienen un elemento en común dentro de su estructura molecular denominado anillo betalactámico, un anillo químico de cuatro átomos.

Lo que hace la lactamasa es romper este anillo, desactivando las propiedades antimicrobianas del antibiótico.

La betalactamasa se da en las bacterias Gram+.

Procedimiento

La prueba de la BLEE consiste en una prueba de difusión para determinar si ciertos antibióticos, como la penicilina y la ampicilina, pueden ser utilizados para tratar una serie de bacterias específicas.

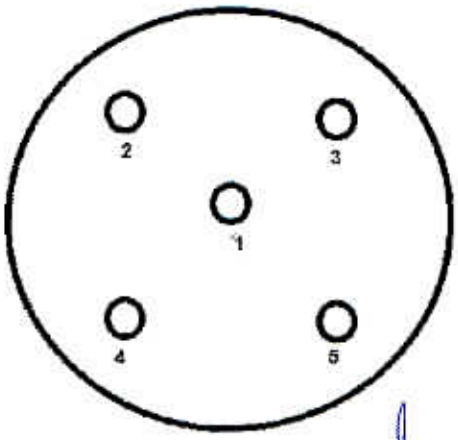
Se toca entre dos a tres colonias aisladas y diferentes con un asa estéril de 1 µl. para hacer un inóculo con turbidez de 0,5 McFarland en suero fisiológico.

Este inóculo se siembra en dos placas de agar Mueller Hinton, en la que se depositarán discos de antibióticos con unas pinzas estériles.

Test de sinergia doble de discos

Como muestra el dibujo, se deben colocar los discos de antibióticos en un determinado orden, a una distancia con respecto al de amoxicilina clavulánico de entre 15 a 20 mm.

1. Amoxicilina clavulánico
2. Cefotaxime
3. Ceftacidime
4. Cefepime
5. Aztreonam



R. RAMOS M.
A. ROJAS
JEFATURA
A. Calero H.

Combinación de discos

Se colocan sobre la superficie del medio agar Mueller Hinton tres discos de antibióticos:

- Cefotaxime-clavulánico
- Ceftazidime-clavulánico
- Cefepime-clavulánico

A diferencia del test de sinergia doble de discos, en esta placa no es necesario un orden, y la distancia ha de ser la necesaria para que no hay interacción entre un disco y otro.

Una vez colocados los discos, se incuba en aerobiosis a una temperatura de 35° C. durante 18 horas.

La lectura se hace como en los procedimientos de antibiograma.

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Castro H

CAPÍTULO 10

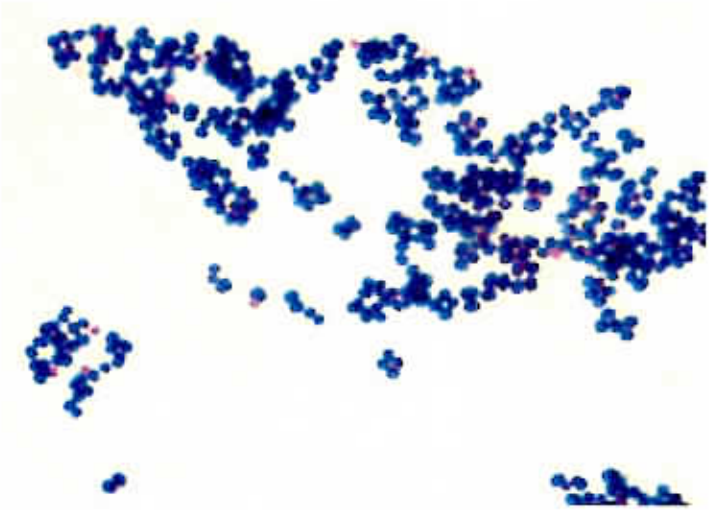
Microorganismos

MICROORGANISMOS

Dos tercios de las bacteriemias extrahospitalarias están producidas por *Staphylococcus aureus* (~7% a 20%), *Streptococcus pneumoniae* (~7% a 12%), *E. coli* (~20% a 40%) y otras enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (~15%), mientras que al menos tres cuartas partes de las intrahospitalarias se deben a estafilococos coagulasa negativos (~14% a 28%), *S. aureus* (~20%, con un porcentaje variable de resistencia a la oxacilina), enterococos (~10%), *E. coli* (~11%), otras enterobacterias (~25%), *P. aeruginosa* (~7%) y *Candida* spp. (~3% a 10%). Aunque en términos absolutos la frecuencia de grampositivos supera la de gramnegativos como agentes causantes de bacteriemia, en los pacientes con sepsis grave dicha proporción es similar, debido a la menor incidencia de sepsis grave en las bacteriemias producidas por estafilococos coagulasa negativos. En los pacientes con sepsis grave no bacteriémica, los bacilos gramnegativos parecen ser predominantes.

Staphylococcus aureus

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram+ que pertenece a la familia *Micrococcaceae* en la que hay 20 especies diferentes, aunque el estafilococo aureus es el que con mayor frecuencia causa infecciones en el ser humano.



Se suele encontrar en la piel y en las mucosas, donde no causa infección. Pero en el momento de producirse una herida, pasa al torrente sanguíneo, donde libera toxinas, causantes de una amplia gama de infecciones.

Los estafilococos fueron descubiertos a principios de la década de 1880 en la ciudad de Aberdeen por el cirujano Alexander Ogston, siendo las primeras bacterias reconocidas como agentes patógenos.

La detección del estafilococo aureus, para diferenciarlo de otros tipos de estafilococo, se efectúa mediante la prueba de la coagulasa. Para una mayor certeza, esta prueba se compagina con la detección de antígenos mediante el test de látex.

Enfermedades causadas por *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* causa enfermedad mediante sus toxinas –manifestaciones clínicas– o por la invasión y destrucción de los tejidos, lo que provoca otras enfermedades debido a la proliferación del estafilococo. En ocasiones, el *Staphylococcus aureus* puede entrar en el torrente sanguíneo desde el sitio de la infección y alcanzar otros tejidos distantes, como el cerebro o los pulmones.

Las enfermedades cuya responsabilidad recae en el *Staphylococcus aureus* son muy diversas. Entre las más destacadas se pueden citar:

- Osteomielitis.
- Conjuntivitis.
- Artritis.
- Infecciones orbitales graves.
- Sinusitis.
- Meningitis.
- Otitis media.
- Mastoiditis.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

- Orzuelos.
- Bronquitis.
- Neumonía estafilocócica primaria.
- Parotiditis.
- Enterocolitis.
- Cistitis.
- Prostatitis.
- Cervicitis.
- Salpingitis.

Epidemiología

Se considera que entre el 20% y el 40% de los adultos sanos son portadores asintomáticos del *Staphylococcus aureus*, o sea, son portadores, pero no padecen infección. El *Staphylococcus aureus* es una bacteria muy resistente y longeva, permaneciendo en el aire o sobre objetos inanimados, aunque el contagio del *Staphylococcus aureus* se produce mayormente de persona a persona.

Hay, también, ciertos condicionantes que predisponen al portador a desarrollar una enfermedad, como pueden ser aquellos que utilizan sistemáticamente agujas –diabéticos, alérgicos, hemodiálisis o drogadictos–, los que padecen enfermedades crónicas de la piel –psoriasis, eczemas o dermatitis atópica– y personal hospitalario.

Los alimentos pueden ser también causa de infección de *Staphylococcus aureus*, siendo más frecuente en verano. Los alimentos más susceptibles de alojar esta bacteria son los productos de pastelería, las ensaladas con patatas y huevos, pollo, jamón, lácteos o cremas heladas.

El *Staphylococcus aureus* tiene dos maneras de provocar la enfermedad; convirtiéndose en un invasor local o generalizado, o bien produciendo toxinas que no invaden directamente el tejido.

R. RAMOS M
A. ROJAS
A. Calato V.
JEFATURA

A través de la infección local, el *Staphylococcus aureus* se caracteriza por la formación de un absceso, pudiendo ser superficial, lo que se denomina forúnculo.

También puede atacar los órganos mediante diseminación bacteriémica, dando lugar a un carbúnculo. En este caso, invade el torrente sanguineo, cuya consecuencia más letal puede ser un shock tóxico.

Prevención

No es posible realizar una prevención absoluta contra el *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, ya que se sabe que los hospitales son uno de los focos de infección más importantes, se impone el uso de mascarillas en las intervenciones quirúrgicas y curaciones de todo tipo, observando igualmente las necesarias medidas de asepsia y antisepsia en la manipulación de algodones, vendas y gasas contaminadas y, obviamente, la adecuada esterilización de todo el instrumental médico y material clínico. En los pacientes de especial riesgo, como son aquellos con heridas abiertas, debe evitarse el contacto en lo posible.

En la actualidad las cepas más habituales de estafilococo aureus son resistentes a la penicilina, por lo que los antibióticos que muestran una mayor eficacia para combatir al estafilococo son los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina, siendo la rifampicina y la vancomicina los que presentan más efectividad. Este tratamiento antimicrobiano, según sea el caso, deberá acompañarse de la eliminación de las vías de entrada como los catéteres venosos permanentes o los drenajes quirúrgicos.

Como sucede en todos los tratamientos, y en especial tratándose del estafilococo aureus, es importante finalizar las dosis prescritas aunque previamente se haya experimentado una clara mejoría. Las dosis incompletas conducen a la resistencia del medicamento por parte del estafilococo aureus.

Hay una cepa de *Staphylococcus aureus* que se ha vuelto resistente a diversos antibióticos. Primero fue la penicilina y posteriormente a la meticilina. Por lo general se contrae en los hospitales, aunque en la actualidad ha proliferado infectando también a poblaciones sanas. En estos casos,

R. RAMOS M

A. ROJAS

vancomicina y linezolid son los antibióticos que han demostrado una mayor efectividad.

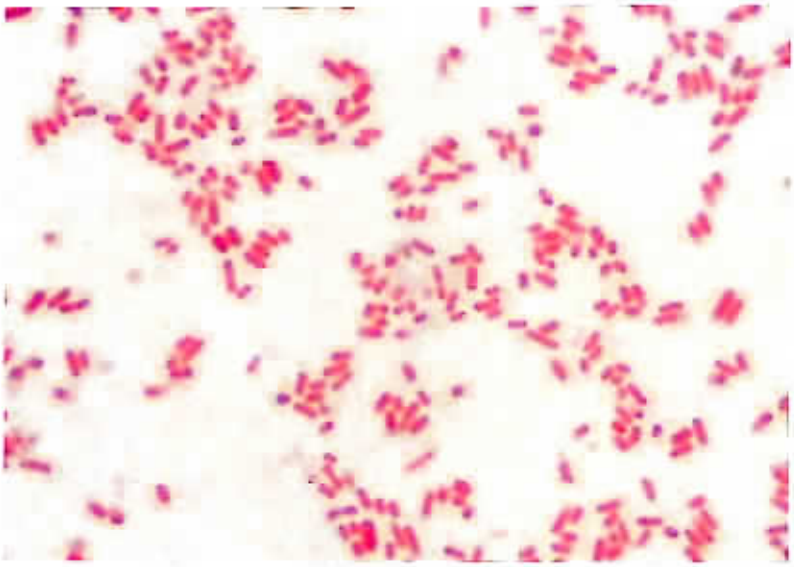
Escherichia coli

Se trata de una enterobacteria Gram- anaerobia facultativa que se mueve por unos flagelos que rodean su cuerpo (peritricos). Se encuentra generalmente en los intestinos animales, aunque se puede encontrar en muchos lugares. Es muy necesaria, junto con otras bacterias, para un proceso digestivo correcto.

No se trata de una bacteria formadora de esporas.

Produce vitaminas B y K y fermenta la glucosa y la lactosa.

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.



En individuos sanos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la flora intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. En humanos, la *Escherichia coli* coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 horas después de la primera comida.

Hemocultivos

Enfermedades causadas por Escherichia coli

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como:

- Infecciones del aparato excretor
- Cistitis
- Meningitis
- Peritonitis
- Mastitis
- Septicemia
- Neumonía

Puede adquirir elementos genéticos que codifican factores virulentos. La *Escherichia coli* está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 ° C.

También puede producir infección urinaria, siendo más frecuente en las mujeres que en los hombres, debido a la corta longitud de la uretra de la mujer (25-50 mm. en mujeres; 15 cm. en los hombres), aunque entre la población de ancianos, la proporción entre hombre/mujer es casi idéntica.

Epidemiología

En función de su adquisición, las bacteriemias se clasifican en comunitarias y nosocomiales. Las nosocomiales son las que aparecen tras las primeras 48 horas del ingreso en el hospital, mientras que las comunitarias son las que se detectan en pacientes no ingresados y en las primeras 48 horas del ingreso en el hospital. Esta clasificación es relativamente reciente, por lo que se dispone de escasa información sobre las bacteriemias comunitarias, y por lo tanto, en el caso de la *Escherichia coli*.

A. ROJAS
A. Cabrera H
E. GALVEZ C.

Tratamiento

El uso de antibióticos es poco eficaz y casi no se prescribe. Para la diarrea se sugiere el consumo de abundante liquido y evitar la deshidratación. Cuando una persona presenta diarrea no debe ir a trabajar o asistir a lugares públicos para evitar el contagio masivo. Sin embargo en algunas patologías como la pielonefritis hay que considerar el uso de alguna cefalosporina endovenosa.

Klebsiella spp.

Klebsiella es un género de bacterias inmóviles, Gramnegativas, anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos. Como frecuentes patógenos humanos, los organismos bacteriales del género *Klebsiella* pueden liderar un amplio rango de estados infecciosos, notablemente neumonía, por ejemplo:

Klebsiella pneumoniae	**Infecciones del tracto urinario, septicemia, e infecciones de tejidos blandos**
Klebsiella ozaenae	**rinitis atrófica**
Klebsiella rhinoscleromatis	**infecciones en vías respiratorias, causando rhinoescleroma o escleroma**

Klebsiella pneumoniae

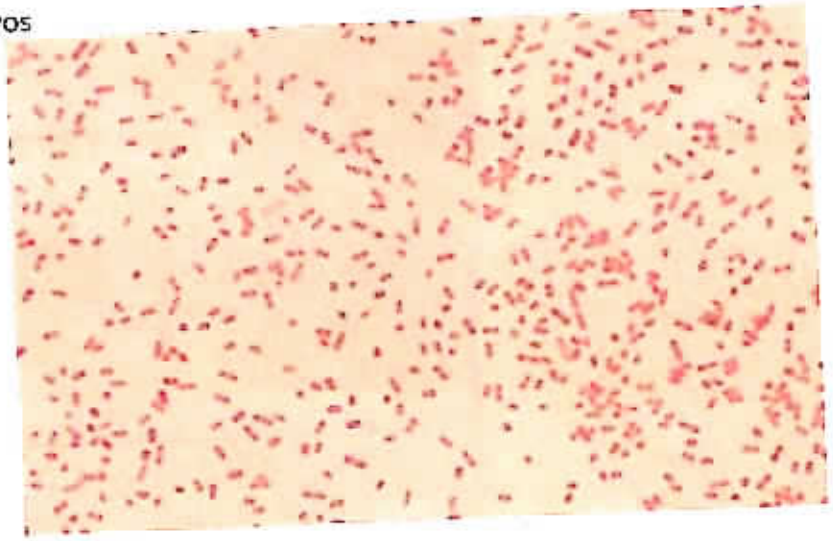
Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*.

Desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX.

En el medio de cultivo agar McConkey se puede observar cómo las bacterias asimilan y fermentan la lactosa, creciendo colonias de color rosado. Sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 °C.

R. RAMOS M
A. ROJAS
A. Cabrera H.
A. GALVEZ C.

Hemocultivos



Enfermedades causadas por *Klebsiella pneumoniae*

Estas bacterias están implicadas en enfermedades nosocomiales, es decir, infecciones que se contraen en recintos de atención a la salud, como hospitales y centros de salud.

Es causante de:

- Infecciones del tracto urinario
- Neumonías
- Sepsis
- Infecciones de tejidos blandos
- Infecciones de herida quirúrgica

Epidemiología

Las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* se suelen contraer en centros hospitalarios. Causan infecciones que no se habian manifestado ni estaban en periodo de incubación, es decir, se adquieren durante su estancia y no son la causa del ingreso.

Son especialmente susceptibles:

- Los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos
- Neonatos
- Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
- Diabetes mellitus

- Alcohólicos

Actualmente se le asocia con la espondilitis anquilosante.

Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales[4] en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema.

También suele encontrarse en las infecciones de la toracotomía para realización de *by pass* o revascularización coronaria.

Tratamiento

Cuando un paciente recibe el diagnóstico de la infección de Klebsiella, se le suele hacer una prueba de sensibilidad para determinar qué antibiótico será efectivo para esa variedad particular de bacteria. Esta prueba también mostrará a qué antibióticos esa variedad de bacteria ha desarrollado resistencia, lo que ayuda a los médicos a escoger el tratamiento adecuado.

Entre los antibióticos a los que las klebsiellas son sensibles están la cefalosporina, imipenem, amikacin y la gentamicin.

Alguna variedad de la bacteria Klebsiella pneumoniae se ha hecho resistente al tratamiento con el antibiótico carbapenem, lo que significa que el antibiótico no funciona para matar la bacteria. Los carbapenems están relacionados con la penicilina y son la última linea de defensa cuando alguien tiene una infección. Las bacterias resistentes al carbapenem pueden ser peligrosas, ya que pueden no conseguirse otras opciones de antibióticos para los pacientes que necesitan tratamiento.

[4] Que se desarrolla en una región restringida o circunscrita de tejido.

R. RAMOS M

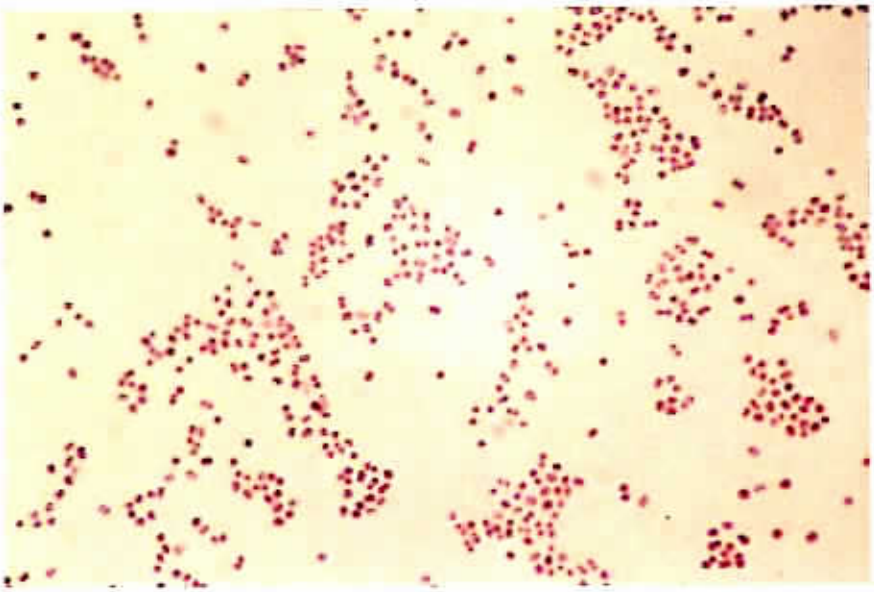
A. ROJAS

A. CALETO H

E. CLIVEZ C

Neisseria meningitidis

Es un diplococo, cocos que se agrupan por parejas, Gram-. Es una bacteria heterótrofa, microorganismo que elabora su propia sustancia orgánica alimentándose de materia elaborada por otros seres vivos.



Es una bacteria inmóvil, aerobia. Se desarrolla a 35° C. Se cultiva en medios enriquecidos con sangre, y es un microorganismo que habita la nasofaringe. Fue descubierta como agente que causa la meningitis en 1887 por el austriaco Anton Weichselbaum, aunque la meningitis fue descrita antes, en 1805 por Vieusseux, durante una epidemia que azotó las afueras de Ginebra, Suiza.

Tiene importancia en salud pública por su papel en la meningitis y otras formas de enfermedad meningocóccica. Sólo afecta a seres humanos ya que no existe ningún reservorio animal (hospedador de largo plazo de un patógeno que causa una enfermedad infecciosa). Es la única forma conocida de meningitis bacteriana en causar epidemias.

Es también conocida por su nombre común: meningococo, y existen distintas cepas de este microorganismo, 13 en total: A, B, C, D, X, Y, Z, E, W-135, H, I, K y L.

Diagnóstico

Se detecta en muestras de LCR y hemocultivos, y se puede identificar mediante la tinción de Gram y la prueba de la oxidadsa. La tinción de Gram puede servir para la muestra de LCR, mientras que en serología se determina mediante pruebas de aglutinación por el test del látex o hemoaglutinación, que se debe a la activación bacteriana.

Epidemiología

Esta bacteria vive en los seres humanos, más concretamente, suele habitar la nasofaringe. Se contagia por gotitas respiratorias entre personas que mantienen un contacto íntimo prolongado. La frecuencia de portadores es mayor entre niños en edad escolar y jóvenes y en población de nivel socioeconómico bajo.

No varía con la estación del año.

La definición de enfermedad epidémica depende de las tasas de incidencia de base de cada país o región. En comparación con las altas epidemias que se dan en África, las epidemias que han azotado a Europa y al continente americano son moderadas, debido a que las tasas de ataque durante una epidemia en estas regiones han sido menores que las tasas de incidencia endémicas en los países africanos.

Como se ha dicho anteriormente, el contagio de *Neisseria meningitidis* se realiza por el contacto prolongado de persona a persona o por inhalación de gotas que las contienen.

La *Neisseria meningitidis* no sobrevive fuera del cuerpo humano, que es su único huésped, ya que no cuenta con ningún reservorio animal. El contacto es usualmente con un enfermo o un portador asintomático que aloja a la bacteria en la nasofaringe y que la transmite por gotas respiratorias o secreciones orales, sobre todo al toser o estornudar.

No resiste a los cambios de temperatura.

En poblaciones abiertas la transmisión de *Neisseria meningitidis* es relativamente lenta y es mayor en poblaciones que viven en áreas confinadas,

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Valero H

E. GALVEZ C.

como internados, cuarteles o colegios, aumentando las probabilidades de contagio en fumadores y enfermos por infecciones respiratorias.

El riesgo de contagio de la enfermedad se desvanece rápidamente en un enfermo después de iniciar la terapia antimicrobiana. En trabajadores de la salud, responsables del cuidado de un paciente con enfermedad por meningococo, únicamente se contagian aquellos que han estado expuestos directamente a secreciones del paciente.

Se ha logrado identificar que cuando hay un caso de enfermedad por meningococo en niños, el riesgo de que uno de sus hermanos se infecte es de 2 a 3%.

Patogénesis

El proceso patogénico de *Nenisseria meningitidis* se inicia con la adherencia de la bacteria a la superficie de las microvellosidades del epitelio de la nasofaringe, donde se multiplica. La adherencia estimula la entrada de la bacteria a las células epiteliales, lo que le permite atravesar el epitelio mucoso mediante vacuolas fagocíticas. La mayoría de las personas que se encuentran colonizadas con *Neisseria meningitidis* permanecen asintomáticas; sin embargo, en un porcentaje menor, el meningococo penetra la mucosa y entra a la circulación, causando enfermedad sistémica.

Unicamente las cepas virulentas que encuentren a un huésped susceptible lo enferman; esto explica por qué existen relativamente pocos casos de enfermedad meningocóccica en relación con el vasto número de personas colonizadas. Por ejemplo, personas que tengan alguna deficiencia en su sistema inmunológico, en especial en anticuerpos con propiedades bactericidas, son las propensas a padecer la enfermedad una vez contagiadas.

Manifestaciones clínicas

La *Neisseria meningitidis* puede producir:

- Otitis
- Artritis
- Conjuntivitis
- Neumonía

La *Neisseria meningitidis* es el agente causante de la meningitis.

El problema que presenta la enfermedad meningocóccica es que sus manifestaciones apenas difieren de las de otras infecciones menos graves del tracto respiratorio superior, por lo que es difícil de detectar en un principio.

La forma habitual de manifestación de la enfermedad meningocóccica es el cuadro de meningitis aguda purulenta.

Las manifestaciones iniciales de la infección de las meninges por la *Neisseria meningitidis* son similares a las de otras meningitis bacterianas. Aún se desconocen algunas cosas sobre la infección, pero se piensa que esta es el resultado de la diseminación de la bacteria por el torrente sanguíneo.

Los síntomas son:

- Inicio súbito de cefalea
- Fiebre
- Rigidez de nuca, como signo más destacado.
- Náuseas
- Vómitos
- Fotofobia
- Alteraciones neurológicas que pueden incluir estupor, delirio, coma y convulsiones

La rigidez severa del cuello produce que las rodillas y cadera del paciente se flexionen cuando se flexiona el cuello. Cierta rigidez de los

tendones de la corva produce incapacidad para enderezar la pierna cuando se flexiona la cadera a 90 grados.

En los niños, la meningitis puede tener un inicio aparentemente más inofensivo, con síntomas atípicos sin rigidez de nuca; sin embargo, el abultamiento de la fontanela puede ser característico, así como otros signos, como irritabilidad y llanto inconsolable, vómitos, convulsiones, rechazo al alimento e hipotonía.

Diagnóstico

El diagnóstico de la meningitis por meningococo se basa en la evaluación del líquido cefalorraquídeo que se extrae mediante punción lumbar. El diagnóstico microbiológico que se ha utilizado clásicamente para identificar a *Neisseria meningitidis* y diferenciarla de otros patógenos comunes se basa en el cultivo en medio apropiado. El más utilizado es el agar Mueller-Hinton.

El serogrupo se identifica después del cultivo por aglutinación de la bacteria obtenida en cultivo puro a partir de las colonias, o directamente en el líquido cefalorraquídeo, ya que por aglutinación por látex se identifica el antígeno. Los hemocultivos se reportan frecuentemente positivos.

Tratamiento

Los antibióticos han reducido hoy día la mortalidad por meningitis, siendo la penicilina el antibiótico más empleado, aunque también se emplea el Cloramfenicol y las cefalosporinas. En cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes se hace uso de la Rifampina.

No es probable que se consiga erradicar la colonización en portadores sanos. Se recomienda la profilaxis con sulfamidas para los individuos expuestos a cepas susceptibles.

Actualmente, se han desarrollado vacunas contra algunas cepas (A, C, Y, etc.), que se administran a niños mayores de 2 años.

R. RAMOS M

A. ROJAS

L. GAVEZ C.

A. Valero H.

Enterobacter spp.

Son bacterias Gramnegativas con forma de bastoncillos. Hay varias cepas de este microorganismo que son gérmenes oportunistas en los hospitales.

Epidemiología

Las enterobacterias se encuentran sobre la piel humana, las plantas, los suelos, el agua, las cloacas, los tractos intestinales y en algunos productos lácteos. Las bacteriemias por enterobacterias están relacionadas con la infección hospitalaria, ya que éstas se encuentran muy difundidas entre los pacientes y en el ambiente hospitalario. En el paciente hospitalizado colonizan tubo digestivo, orofaringe, aparato genitourinario y piel. En el ambiente hospitalario pueden aislarse del agua, catéteres, sondas, sueros, antisépticos, equipos de respiración mecánica, etc.

Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias en estos pacientes: el uso cada vez más frecuente de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas (catéteres intravenosos, endoscopios, intervenciones, etc.), el empleo de potentes inmunosupresores y las internaciones prolongadas. Además, ciertas patologías predisponen a las

infecciones por gérmenes gramnegativos (enfermedades hematológicas, neoplasias, cirrosis, insuficiencia renal crónica, diabetes, etc.).

El *Enterobacter* spp. es una bacteria colonizadora del tracto intestinal que, en ocasiones, causa infecciones oportunistas en pacientes debilitados.

Infecciones por *Enterobacter* spp.

La infección urinaria en los adultos es muy frecuente, dándose un mayor porcentaje en las mujeres, debido al menor tamaño de la uretra comprada con la de los hombres, como ya se ha indicado anteriormente.

El 99% de las infecciones del tracto urinario se producen por la migración hacia este de enterobacterias que habitualmente colonizan el intestino grueso. Se piensa que la colonización de la mucosa vaginal y del prepucio es el primer paso a una infección urinaria. De aquí, estos microorganismos ascienden a la próstata, vejiga o vía urinaria superior, donde se desarrollan y producen la infección. La presencia de cuerpos extraños, como sondas o catéteres, también pueden ser foco de infección, aunque en todos los casos, si se dan condiciones en el individuo que provoquen deficiencia en su sistema inmunitario, se puede favorecer la infección.

Otra vía de acceso de los gérmenes al tracto urinario es el torrente sanguíneo.

En la vagina, el *Enterobacter* spp. puede causar malestar y secreción.

Es también causante de la neumonía nosocomial.

También puede causar peritonitis, cuando la infección por este microorganismo es intraabdominal.

Tratamiento

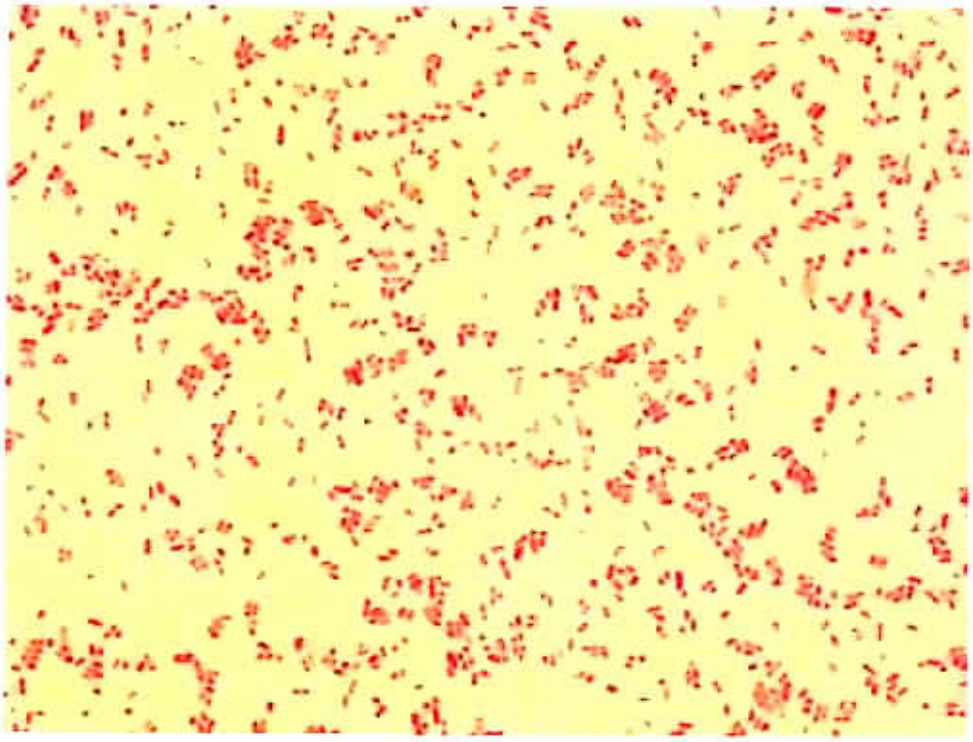
Como bacteria Gram-, el Enterobacter spp. es sensible a la penicilina. No obstante, las enterobacterias tienen la capacidad de adquirir rápidamente resistencia a los antibióticos y en los últimos años, un porcentaje cada vez mayor de estas bacterias, especialmente *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp., han adquirido resistencia, incluso a las cefalosporinas de tercera generación, debido a la producción de beta-lactamasas de espectro extendido.

R. RAMOS M.
A. ROJAS
JEFATURA
A. CUEVA H.

Serratia spp.

La *Serratia* spp. es una enterobacteria Gram-, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, que crece bien en agar sangre, agar chocolate y agar McConkey, produciendo colonias que pueden ser pigmentadas, especialmente *Serratia marcescens y Serratia rubias,* las cuales producen un pigmento rojo muy característico. Crece bien a temperaturas que oscilan entre los 5-40º C.

Es un microorganismo motil, esto es, que tiene la habilidad de moverse espontánea e independientemente.



Como ya se ha indicado, una de las características de las colonias de las serratias es su pigmentación roja intensa. Hay constatada una anécdota histórica, que ocurrió en el año 332 a.C. contada por Quinto Curcio Rufo en su "*Historia de Alejandro*":

Tras una serie de victorias, Alejandro Magno se encuentra asediando con sus tropas la ciudad de Tiro, en la costa de lo que hoy en día es el Libano.

El asedio dura meses, y la resistencia de la ciudad estaba agotando a las tropas de Alejandro. De pronto, tuvo lugar un suceso que cambiaria el curso de los acontecimientos.

> "*...unos soldados, en el momento de cortar unas rebanadas de pan, vieron brotar unas gotas de sangre; el rey se asustó y Aristandro, el más entendido de los adivinos, declaró que si la sangre hubiera circulado desde fuera hacia adentro hubiera sido un mal presagio, pero puesto que fluía de dentro hacia fuera, era un buen augurio: anunciaba la victoria sobre la ciudad sitiada*".

Nadie puede asegurar cuánto influyó en el ánimo y en el triunfo final este prodigio, pero lo cierto es que Tiro cayó derrotada y fue objeto de un sanguinario saqueo por parte de las tropas de Alejandro. El episodio aparece confirmado por otro historiador, el griego Diodoros Siculus que, dos siglos después de Curcio Rufo, escribió:

> "*los pedazos de pan partido tenían apariencia sangrienta*".

Probablemente se trata de la primera referencia de una contaminación debida a *Serratia marcescens*.

No fue, sin duda, el único caso datado en la historia. Probablemente, las historias narradas durante la Edad Media en las que se daba aparición de sangre en el pan utilizado en la ceremonias cristianas, tengan su explicación por la contaminación de *Serratia* spp.

Patologías causadas por *Serratia* spp.

Puede provocar:

- Conjuntivitis
- Queratitis
- Infecciones en heridas
- Infecciones en riñones y vías urinarias
- Infecciones respiratorias
- Meningitis
- Endocarditis

R. RAMOS M.
A. ROJAS
JEFATURA
A. CANTO H.

Esta bacteria afecta especialmente a pacientes hospitalizados y a pacientes que tienen la inmunidad disminuida por enfermedades sistémicas o tratamientos médicos inmunosupresores.

Epidemiología

Suele desarrollarse bien en condiciones húmedas, por eso, se encuentra en los baños y las alcantarillas. Puede eliminarse fácilmente mediante el uso de desinfectantes como la lejía, aunque se desaconseja abusar de la dosis, ya que pueden desarrollar inmunidad.

Para prevenir las infecciones de *Serratia*, se requiere ropa protectora y lavado de manos y la esterilización apropiada de instrumentos médicos, especialmente aparatos respiratorios y catéteres, es esencial. Mantener un ambiente limpio en el baño es también importante.

El género *Serratia* se ha convertido en la actualidad en una cepa endémica en muchos hospitales produciendo infecciones en general nosocomiales en ocasiones asociadas a catéteres.

No suele darse este microorganismo en una bacteriemia extrahospitalaria en un paciente sin patología de base. Existe bibliografía en la que se explican casos

> *"de bacteriemia asociada a colecistitis aguda supurada y sepsis secundaria en un paciente sin enfermedades subyacentes".*

Tratamiento

Como en muchos tipos de infecciones por bacterias, el mejor tratamiento son los antibióticos.

No obstante, la *Serratia marcescens* es resistente a ciertos tipos de antibióticos, como lo muestran las estadísticas de agosto del 2010. En concreto, es resistente a la ampicilina, macrólidos y cefalosporinas de primera generación. De acuerdo con eMedicine, el tratamiento preferible es el amikacin, junto con el cefpirome. Otros antibióticos efectivos incluyen gentamicina, quinolones y el más nuevo cefalosporina.

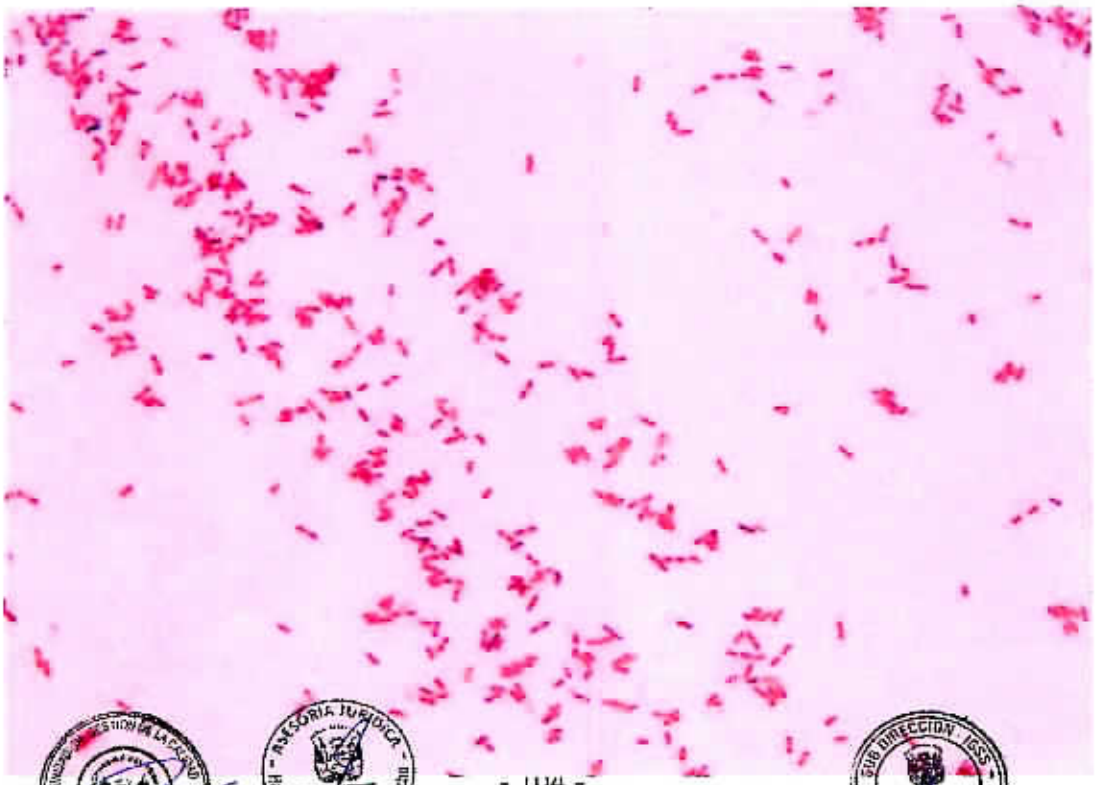
Sin embargo, estudios recientes muestran que la *Serratia marcescens* está empezando a presentar resistencia a la gentamicina, así que las drogas más recientes deben ser más efectivas para atacar la infección.

En algunos casos, las infecciones de *Serratia* pueden provocar abscesos, que son inflamaciones de áreas llenas de pus que aparecen en un área infectada (por ejemplo, los pulmones). Los abscesos resultantes de la *Serratia* pueden requerir drenaje quirúrgico además del tratamiento con antibióticos.

El tratamiento para infecciones leves puede realizarse con trimetoprim, sulfamidas o fluoroquinolona. Para infecciones más graves, se utilizan fluoroquinolonas, carbapenemes, o más frecuentemente cefalosporinas de tercera generación, generalmente asociado a la gentamicina.

Pseudomonas aeruginosa

La *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria oportunista del ser humano y de algunas plantas. Es un microorganismo Gram-, aeróbico, rectos o ligeramente curvados con motilidad unipolar, esto es, se mueve por la acción de unos flagelos que se encuentran en uno de los extremos del microorganismo.



R. RAMOS M
A. ROJAS
A. Ortiz H.
K. VALVEZ C.

- Personas que se han sometido a algún tipo de cirugía
- Pacientes que tienen un catéter o están intubados

Además de la resistencia a los antimicrobianos, también son muy resistentes a los desinfectantes.

Los hospitales presentan el mayor reservorio de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que en la actualidad, es uno de los microorganismos oportunistas más importantes en el medio hospitalario, debido a su gran adaptabilidad fisiológica, potencial metabólico y mecanismos de virulencia.

Rara vez las *Pseudomonas aeruginosa* provocan infección en personas que tienen sus defensas en condiciones normales.

Para que haya Infección, se deben dar una serie de factores que predisponen a la persona a padecer la infección.

Estos son:

- Enfermedades malignas hematológicas, metabólicas
- Pacientes inmunocomprometidos
- Pacientes con fibrosis quística
- Complicaciones infecciosas de heridas y quemaduras
- Infección en pacientes con otitis externa
- Infecciones en piel, ojos y tracto genito-urinario
- Infecciones sistémicas generalizadas
- Neumonías asociadas a ventilador mecánico

Es así que esta bacteria es causante de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, que presentan quemaduras fibrosis quística, bronquitis crónica y cáncer.

Las *Pseudomonas aeruginosa* constituyen uno de los microorganismos más frecuentes responsables de bacteriemia, de neumonía asociada a ventilación mecánica, así como un microorganismo posible en determinados pacientes con neumonía comunitaria grave, especialmente si presentan como patología subyacente una enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

A. ROJAS
JEFATURA
L. GALVEZ C.
A. CUEVA H.

Aunque la patogenidad que producen las *Pseudomonas aeruginosas* no está del todo esclarecida, se considera que la alta virulencia está producida por las toxinas que libera durante el proceso infeccioso.

Infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa*

Las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* se producen en:

- Tracto pulmonar, en pacientes hospitalizados graves, politraumatizados, con procesos crónicos o fibrosis quística. Es el grupo de pacientes con una mayor probabilidad de muerte.
- Tracto urinario, en enfermos portadores de catéteres o secundarias a exploraciones de las vías urinarias.
- Tejidos.
- Infecciones oculares y óticas como queratitis bacteriana y otitis externa crónicas.
- Heridas, infecciones de la piel como exantema vesiculo-papuloso o infección de quemaduras.
- Sangre. La bacteriemia se produce en el 10-20% de los casos. En algunos casos, aparece ectima gangrenoso como complicación de ésta infección.
- Infecciones osteoarticulares en traumatismos penetrantes o procedimientos quirúrgicos.
- Endocarditis, generalmente en la válvula tricúspide.
- Meningitis con poca frecuencia, generalmente en intervenciones de neurocirugía.

Las *Pseudomonas* pueden provocar neumonía y dermatitis, esta última como consecuencia de beber agua contaminada por esta bacteria.

También son causantes de foliculitis, producida por tinas de agua caliente que carecen de un control higiénico periódico.

Tratamiento

La *Pseudomona aeruginosa* tiene la propiedad de unirse a las superficies durante el proceso de infección, lo que las hace más resistentes, aumentando la dificultad en el uso de antibióticos durante el tratamiento.

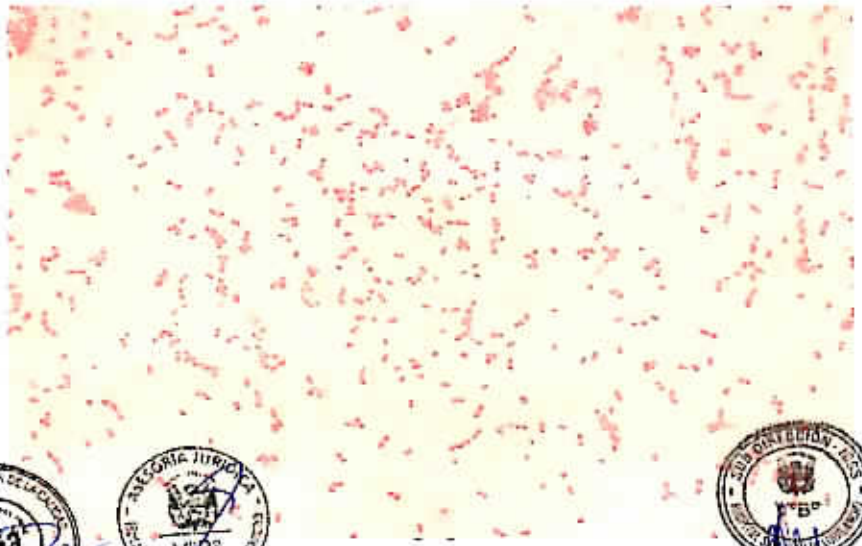
Eso convierte a las infecciones por *Pseudomonas aeruginosas* en enfermedades problemáticas, debido a su resistencia a muchos antibióticos. Además, algunas cepas han desarrollado una resistencia a los desinfectantes, por lo que llegan más fuertes al organismo humano, sólo siendo útiles antibióticos más avanzados.

No obstante, hay una ventaja cuando se produce una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, y es que es fácilmente distinguible de otras producidas por otros bacilos Gram- y otros patógenos. Por ello, los pacientes infectados con pueden recibir un tratamiento con rapidez.

Sin embargo, se sugiere por algunos profesionales el contrastar por antibiograma antes de indicar un antibiótico más que elegirlo de manera directa, tanto para evitar fortalecer a la cepa frente al antibiótico en cuestión y como medida de precaución frente a especies que ya han desarrollado la resistencia.

Acinetobacter baumannii

Es una bacteria Gram-, aerobia no fermentadora. Se trata de un bacilococo que no es móvil, oxidasa-negativo, y que al microscopio, se ve agrupado por parejas.



R. RAMOS M
A. ROJAS
A. Chem H
K. GALLEZ C.

Fue identificado en 1954 por Brisou y Prévot.

El *Acinetobacter* está muy extendido en la naturaleza, y su función principal es la mineralización del suelo, que es la superficie donde se encuentra. Se da en climas calurosos y húmedos.

La mayoría de las cepas crecen bien sobre el agar McConkey. Aunque se clasifican como no fermentantes de la lactosa, a menudo pueden fermentar parcialmente la lactosa cuando crecen sobre el agar McConkey.

El género *Acinetobacter* comprende 17 especies validadas y 14 sin validar. Su clasificación es extensísima, pero se puede resumir en dos grupos:

- Especies oxidadoras de glucosa, entre las que *Acinetobacter baumannii* es la especie más frecuente
- Especies no oxidadoras de glucosa

Epidemiología

El *Acinetobacter baumannii* es un patógeno oportunista que causa infecciones en los hospitales, mayormente neumonía y bacteriemia en pacientes críticos y quemados. Son capaces de sobrevivir en diversas superficies durante semanas, tanto húmedas como secas en el ámbito hospitalario.

El *Acinetobacter baumannii* entra al cuerpo por heridas abiertas, catéteres o tubos de respiración.

Usualmente infecta a pacientes inmunodeprimidos, como:

- Heridos
- Ancianos
- Niños con enfermedades del sistema inmune
- Trasplantados

Su colonización no representa ninguna amenaza para los sanos, aunque los trabajadores de los servicios de salud y visitantes de hospital pueden quedar colonizados y llevar la bacteria a otros lugares.

El número de infecciones hospitalarias causadas por *Acinetobacter baumannii* se ha incrementado en años recientes incluso en los países desarrollados; al igual que la mayoría de los patógenos nosocomiales.

Ocasionalmente se aislan de los productos alimenticios y algunas cepas son capaces de sobrevivir sobre diversos equipos médicos e incluso sobre la piel humana sana.

Infecciones causadas por el *Acinetobacter baumannii*

Es causa frecuente de:

- Neumonia nosocomial, asociada sobre todo a ventilación mecánica
- Infecciones de piel y heridas
- Bacteriemia
- Meningitis

Tratamiento

En el pasado, esta especie bacteriana no representaba un problema en el ámbito hospitalario, ya que era susceptible a diferentes antibióticos. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la aparición de resistencia múltiple, incluida la penicilina.

Además, la resistencia a múltiples antibióticos puede, a su vez, favorecer la persistencia, ya que los pacientes infectados pueden actuar como reservorios.

Muchas instituciones médicas señalan que la prevención, como por ejemplo, lavarse las manos, puede ser más efectiva que el uso posterior de antibióticos.

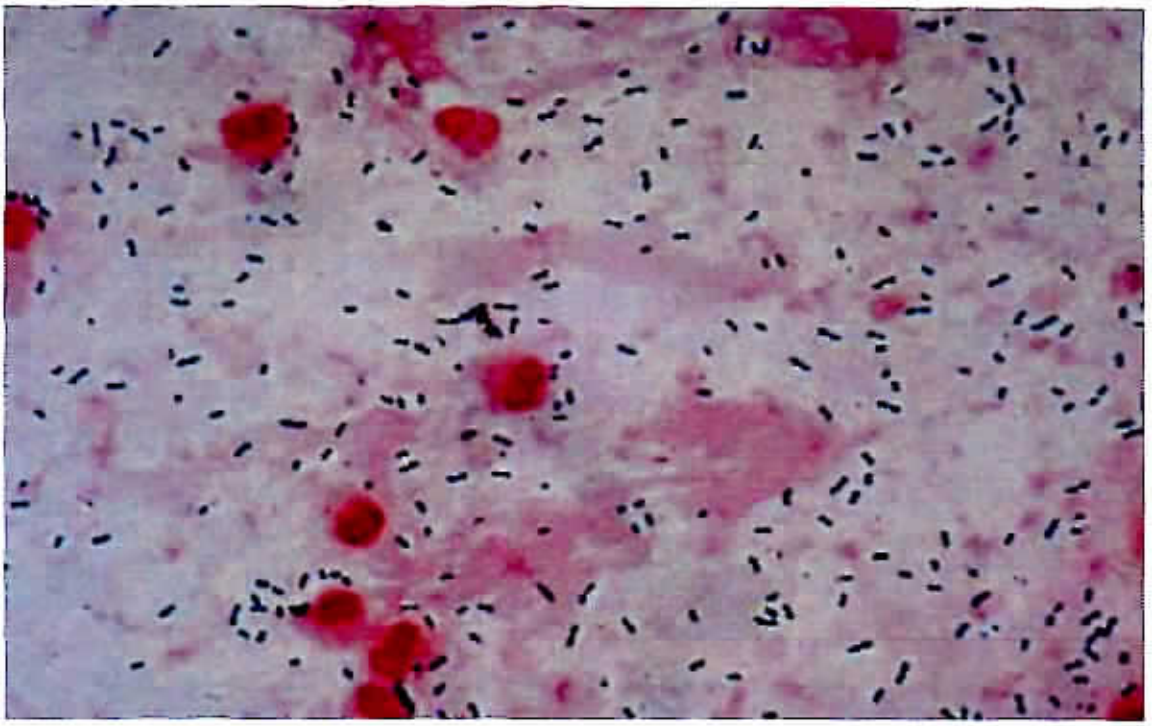
Recientemente se está probando con bacteriófagos, virus que infectan exclusivamente a las bacterias, dando buenos resultados.

Hay sensibilidad del Acinetobacter baumannii ante los antibióticos β-lactámicos.

Se ha descubierto que el etanol estimula la virulencia de *A. baumannii*.

Streptococcus pneumoniae

Es una bacteria oval Gram+, inmóvil y que no forma endosporas. Al microscopio se ve en forma de diplococo (cocos agrupados en parejas), aunque algunas circunstancias pueden hacer que se agrupen en forma de cadena, de ahí el nombre de estreptococo. Es microaerófilo y catalasa negativo.



Suele habitar la nasofaringe, y de aquí es de donde invade el organismo.

Se le conoce también por el nombre común de Neumococo.

Se le identificó como causante de la neumonía a finales del siglo XIX, aunque no fue hasta 1974 que se le dio el nombre de *Streptococcus pneumoniae*, debido a que crece en los medios líquidos.

La identificación en laboratorio del Streptococcus pneumoniae se realiza mediante tres pruebas:

- Solubilización en presencia de sales biliares
- Sensibilidad frente a la optoquina
- Reacción capsular frente a antisueros específicos

En los cultivos se encuentran colonias transparentes y/u opacas.

Infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*

El *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno α-hemolítico casi exclusivo del ser humano. Las enfermedades que puede causar son:

- Neumonia
- Sinusitis
- Peritonitis
- Meningitis
- Septicemia

Afecta mayormente a ancianos, niños y personas inmunodeprimidas.

Epidemiología

Como se ha señalado, el *Streptococcus pneumoniae* habita en la nasofaringe, y de ahí puede colonizar el organismo. Se adhiere a las células nasofaríngeas por unas sustancias que tiene en la superficie bacteriana.

Una vez ha colonizado, puede persistir durante un periodo que oscila entre las 2-4 semanas, aunque se han documentado casos de 6 meses.

Luego de la colonización de la nasofaringe se produce una infección si los microorganismos pasan a zonas adyacentes, como los senos paranasales o la trompa de Eustaquio. Su eliminación se dificulta porque el microorganismo provoca edemas en la mucosa nasal.

También puede provocar infección por contagio, que se da por contacto cercano y prolongado, aumentando las probabilidades si este se da en lugares cerrados, como albergues, hogares de ancianos, prisiones, salas de cuna, etc.

Sin embargo, el riesgo no aumenta en los colegios, lugares de trabajo u hospitales.

El riesgo de infección aumenta en invierno y disminuye en verano.

Si los microorganismos son inhalados y entran en los bronquios o los alvéolos pulmonares y no son eliminados, puede aparecer neumonía. Entre las causas que pueden dificultar la eliminación de la bacteria estarían:

- Presencia de infección vírica

R. RAMOS M. A. ROMAS JEFATURA K. GALVEZ C. A. CEDEÑO H.

- Humo de tabaco o cualquier otra sustancia que aumente la mucosidad
- Disminución de la acción ciliar

Lo que hace resistente al *Streptococcus pneumoniae* es que forma una cápsula que lo protege incluso de la fagocitosis, lo que da comienzo al proceso de infección. Esta protección se debe a que la cápsula consigue bloquear el reconocimiento de la bacteria a las células fagocíticas.

Los síntomas de la enfermedad que causan se deben a la inflamación de los tejidos que producen.

También en la patogenicidad actúa la autolisina que al producir la lisis de la bacteria esta vierte sus contenidos y aumenta la reacción de inflamación. También en la meningitis se liberan aminoácidos excitadores por el tejido neuronal lo que contribuye a las lesiones de esta enfermedad.

Tratamiento y prevención

El incremento de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los antibióticos que se ha producido en los últimos años ha dado lugar a un renovado interés por este microorganismo causante de numerosas infecciones localizadas preferentemente en el tracto respiratorio, desde su descubrimiento hace más de un siglo.

Las infecciones no invasivas pueden curarse por sí solas en unos días, por lo que no suelen precisar de medicamentos especiales. Los médicos recomiendan, en estos casos, beber mucho líquido y tomar analgésicos para aliviar los síntomas.

En el caso de las infecciones invasivas causadas por el *Streptococcus pneumoniae*, se requiere atención médica inmediata y hospitalización en muchos casos, para evitar complicaciones, sobre todo en casos de meningitis.

Si el tratamiento se llevará a cabo en casa, es posible que el médico prescriba un tratamiento de 7 días de antibióticos para aliviar los síntomas más comunes causados por las infecciones causadas por el *Streptococcus pneumoniae*.

R. RAMOS M
A. ROJAS
L. GALVEZ C.
A. Calero H.

Hemocultivos

Algunos efectos secundarios de los antibióticos usados para tratar enfermedades como la neumonía son:

- Náuseas
- Vómitos
- Diarrea

También se emplean el uso de vacunas, aunque están contraindicadas en:

- Adultos
- Pacientes con algún tipo de hipersensibilidad a la vacuna en cuestión
- Embarazadas

Se puede evitar el contagio por Streptococcus pneumoniae mediante medidas básicas de higiene, como:

- Lavarse las manos habitualmente, y en especial después de tocar boca y nariz
- Procurar taparse con un pañuelo a la hora de toser y estornudar
- No compartir vasos ni utensilios de cocina con extraños o personas que se sospeche que puedan portar el germen
- Evitar el consumo excesivo de alcohol, ya que debilita las defensas
- Dejar de fumar

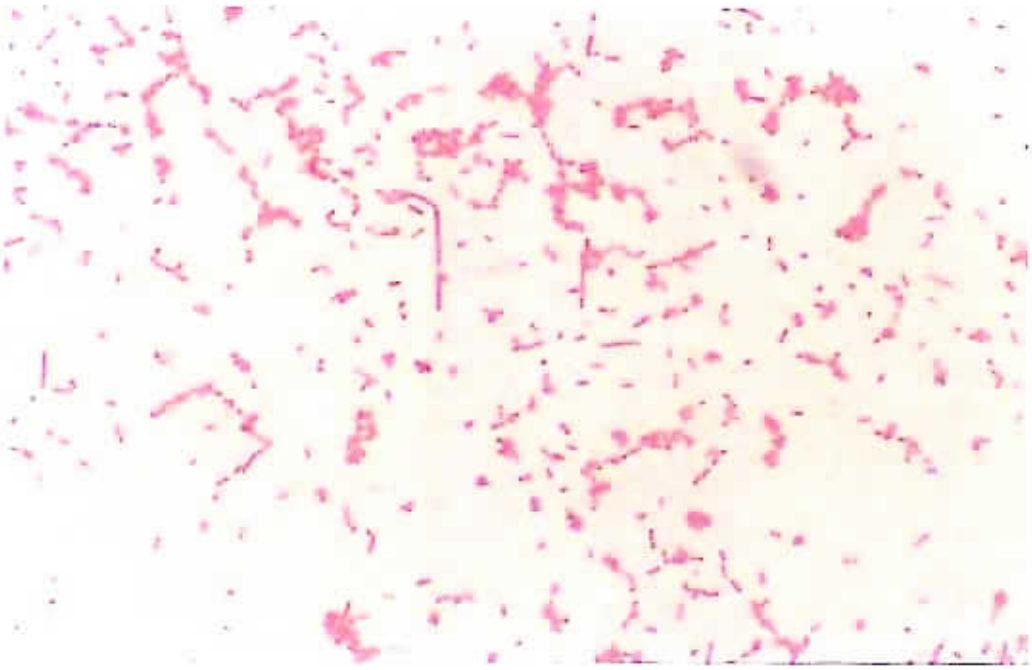
A. ROJAS

A. Calvo H.

Proteus mirabilis

Se trata de una bacteria Gram-. Es anaeróbica facultativa, con motilidad y muestra aglutinación y actividad ureasa.

En los medios de cultivo forma colonias redondeadas.



Se suele encontrar en el tracto intestinal de los seres humanos y es conocido por su habilidad para aglutinarse.

Patogénesis

El *Proteus miriabilis* tiene la capacidad de producir grandes niveles de ureasa, la cual hidroliza la urea a amoniaco, haciendo que la orina se vuelva más alcalina.

Al aumentar la alcalinidad, se forman cristales de estruvita, carbonato de calcio y/o apatita.

Esta bacteria puede encontrarse en cálculos, y esas bacterias escondidas allí, pueden reiniciar una infección post tratamientos antibióticos. Al desarrollarse los cálculos, después de un tiempo pueden seguir creciendo más y causar obstrucción, lo que puede llevar a una insuficiencia renal.

R. RAMOS M.
A. ROJAS
E. GALVEZ C.
Colom H.

Enfermedades causadas por el *Proteus miriabilis*

El *Proteus miriabilis* puede causar:

- Infecciones de heridas
- Septicemia
- Neumonias
- Uretritis
- Cistitis
- Prostatitis
- Pielonefritis

Las piedras suelen ser un indicador de infección crónica por *Proteus miriabilis*.

Los síntomas de la uretritis suelen ser leves. Las mujeres presentan disuria, piuria, y aumento de la frecuencia de la micción. Los síntomas que aparecen en los hombres suelen ser leves y pueden incluir secreción uretral.

Los signos y síntomas de la cistitis suelen ser más prominentes en comparación con los de la uretritis. En tanto los hombres como las mujeres, los síntomas son de inicio súbito. Se incluyen disuria, aumento de la frecuencia, urgencia, dolor suprapúbico, dolor de espalda, los pequeños volúmenes, el aspecto concentrado, y hematuria. Si el paciente está febril, esto podría ser un signo de bacteriemia y sepsis inminente. Estos síntomas pueden no estar presentes si el paciente tiene un catéter permanente.

La prostatitis es obviamente limitada a los hombres y se produce con más intensidad que la cistitis.

Tratamiento

Una muestra de orina alcalina es un posible signo de *Proteus mirabilis*, y es fácil de diagnosticar en el laboratorio debido a su característica motilidad agrupada, e inhabilidad para metabolizar lactosa en el medio agar McConkey. El *Proteus mirabilis* produce un olor a pescado podrido muy característico.

El *Proteus mirabilis* es generalmente susceptible a muchos antibióticos como tetraciclinas.

Microorganismos contaminantes

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.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

E. GALVEZ C.

Calero H.

BIBLIOGRAFÍA

- Elena Loza Fernández de Bobadilla, Ana Planes Reig, Marta Rodríguez Creixems. Hemocultivos. 2003. 2ª edición. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica.
- Paul, E.A., and F.E. Clark. Soil Microbiology and Biochemistry. 1996. Academia Press. N.Y.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S, Seifert H, Wenzel R, Edmond M. Nosocomial Bloodstream Infections in U.S. Hospitals: Analysis of 24.179 Cases From Aprospective Nationwide Surveillance Study. Clin Infect. Dis. 2004.
- Vallés J, Rello J, Ochagavia A, Garnacho J, Alcalá M.A. Community-adquired Bloodstream Infection in Critically Ill Adult Patients: Impact of Shock and Inappropiate Antibiotic Therapy on Survival. Chest. 2003.
- J.W. Benett. Seeing Red: The True Story of Prodigiosin. Adv. Appl. Microbiol. 2000.
- Mensa J, gatell J.M., Azanza J.R., Dominguez-Gil A, García J.E., Jiménez de Anta M.T., Prats G. Guía Terapéutica Antimicrobiana. 2005. Ed. Masson.
- Casanueva F, Gallardo J, Collazos J, García-Calvo M, de la Morena J. Colecistitis Aguda Supurada y Sepsis por Serratia Adquirida Extrahospitalariamente. 1979. Rev. Clin. Esp.
- García-Vázquez E, Gómez J, Herrero J.A., Arias V. Bacteriemia por Serratia Marcescens en Paciente con Coleitiasis. 2012. Arán Ediciones, S.L.
- Popat, R, Crusz A, Diggle S. The Social Behaviors of Bacterial Pathogens. 2008. British Medical Bulletin.
- Álvarez F, Palomar M, Olaechea P, Insausti J, Bermejo B, Cerdá E, et al. Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Cal

en Unidades de Cuidados Intensivos. Informe del año 2002. 2005. Med. Intensiva.

- Cáceres Guido. Optimización del Uso de Antibióticos en Pediatría y Neonatología. 2009
- Muñoz-Price L.S., Weinstein R.A. Infecciones por Acinetobacter. 2008
- Joaquín Ruiz, Encarna Simarro, Joaquín Gómez. Resistencias y Tratamiento de Streptococcus Pneumoniae. 2001. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. Vol, 19, Nº 4.
- Frénod, Emmanuel. Existente Result for a Model of Proteus Miriabilis Swarm. Diferencial and Integral Equations. 2006.
- www.joseacortes.com/microbiologia

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. GALVEZ C.

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Castro P

HEMOCULTIVOS

Profesionales de la Sección Bacteriología General, Dra. Patricia García C.* y Carlos Pérez C.*

*Pontificia Universidad Católica de Chile

1.0 INTRODUCCIÓN

A pesar de la disponibilidad de nuevos antibióticos, se estima que en los Estados Unidos ocurren alrededor de 200.000 casos de septicemia al año con un 20 a 50% de mortalidad (31).

La infección del torrente sanguíneo o bacteriemia, constituye un cuadro clínico grave con una incidencia en Chile de 1,8 /1000 egresos hospitalarios (1). Sin embargo existe un porcentaje de sub-notificación importante. Actualmente no se la considera una enfermedad de notificación obligatoria.

El hemocultivo o cultivo microbiológico de la sangre constituye en los casos de septicemia, el único examen que permite su confirmación. Se define como hemocultivo al cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por una punción independiente.

En el último tiempo han ocurrido varios cambios, tales como el aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, la necesidad de aislar microorganismos no habituales y el advenimiento de sistemas automatizados para los hemocultivos. Es por ello que es importante revisar algunos aspectos como: Indicación de los hemocultivos, clasificación de estos, toma de la muestra (momento de la obtención, número de hemocultivos, volumen de sangre), diferenciación de bacteriemia versus contaminación, sangre por catéter versus punción periférica, utilidad de los hemocultivos anaeróbicos, utilidad de los hemocultivos con resinas, microorganismos especiales, sistemas de hemocultivos e impacto de la automatización e interpretación de los resultados obtenidos.

1.1 INDICACIONES PARA LOS HEMOCULTIVOS

La indicación clásica de obtener hemocultivos, es la sospecha de bacteriemia en pacientes con o sin foco aparente de infección. Los factores clásicos asociados a la presencia de bacteriemia verdadera, son la presencia de calofríos y fiebre mayor a 38.3°C, existencia de enfermedades subyacentes severas (usualmente mortales a un plazo no mayor a 5 años), cuadros de abdomen agudo y el antecedente de drogadicción intravenosa (3). También todas aquellas infecciones que producen bacteriemias continuas, como la endocarditis infecciosa y en general, las infecciones endovasculares (26). En los casos en que no existe alguno de estos marcadores de bacteriemia o cuando el paciente ya está recibiendo antimicrobianos, la probabilidad de aislar agentes infecciosos en hemocultivos disminuye en forma muy significativa.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, pues los microorganismos son distintos según si se trata de un paciente inmunosuprimido o inmunocompetente, también si se trata de pacientes adultos o pediátricos o si se trata de

R. RAMOS M.

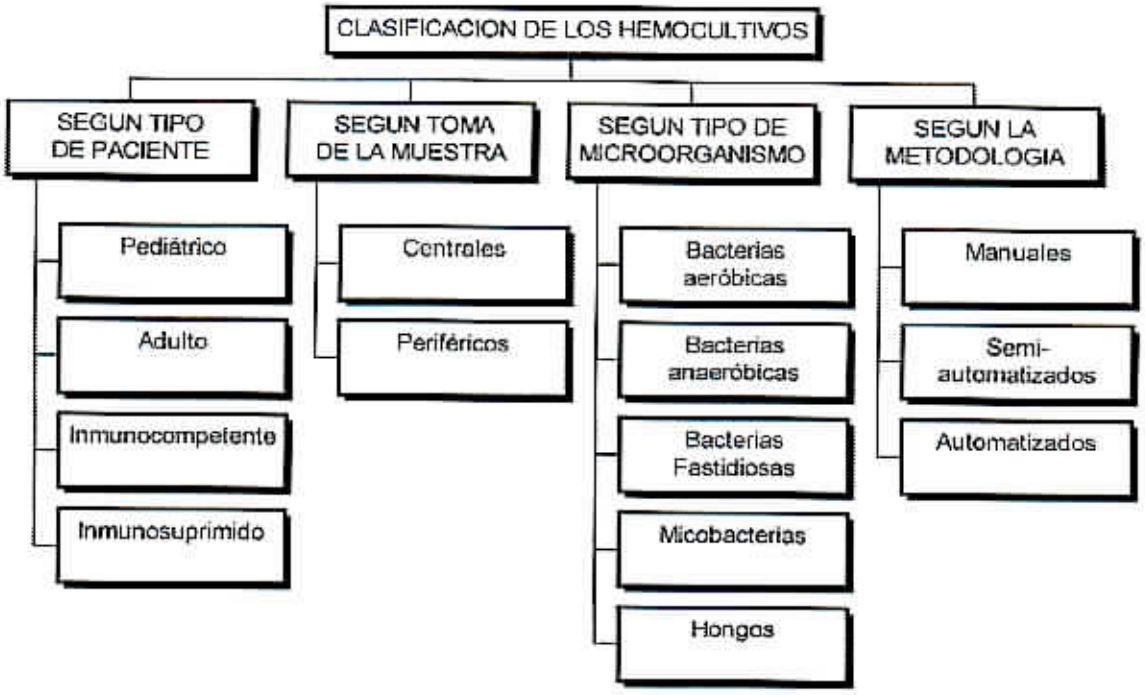
A. ROJAS

A. CELIS H.

enfermos que estén o no bajo terapia antimicrobiana. Según la toma de la muestra pueden ser hemocultivos periféricos o centrales (obtenidos a través de un catéter venoso central).

También pueden clasificarse según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos según si se sospechan bacterias aeróbicas, anaeróbicas, fastidiosos, micobacterias u hongos. Por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), en sistemas semiautomatizados como el sistema Lisis-centrifugación o en sistemas automatizados como BACTEC, BacT/Alert, Septichek, etc. (Figura N°1).

Figura N°1: Clasificación de los hemocultivos según tipo de paciente, toma de muestra, tipo de microorganismo y metodología



2.0 SISTEMAS DE HEMOCULTIVOS SEGÚN METODOLOGÍA

Diferentes metodologías se traducen en distinto rendimiento en cuanto a sensibilidad y rapidez en la detección de las bacterias en el torrente sanguíneo (40).

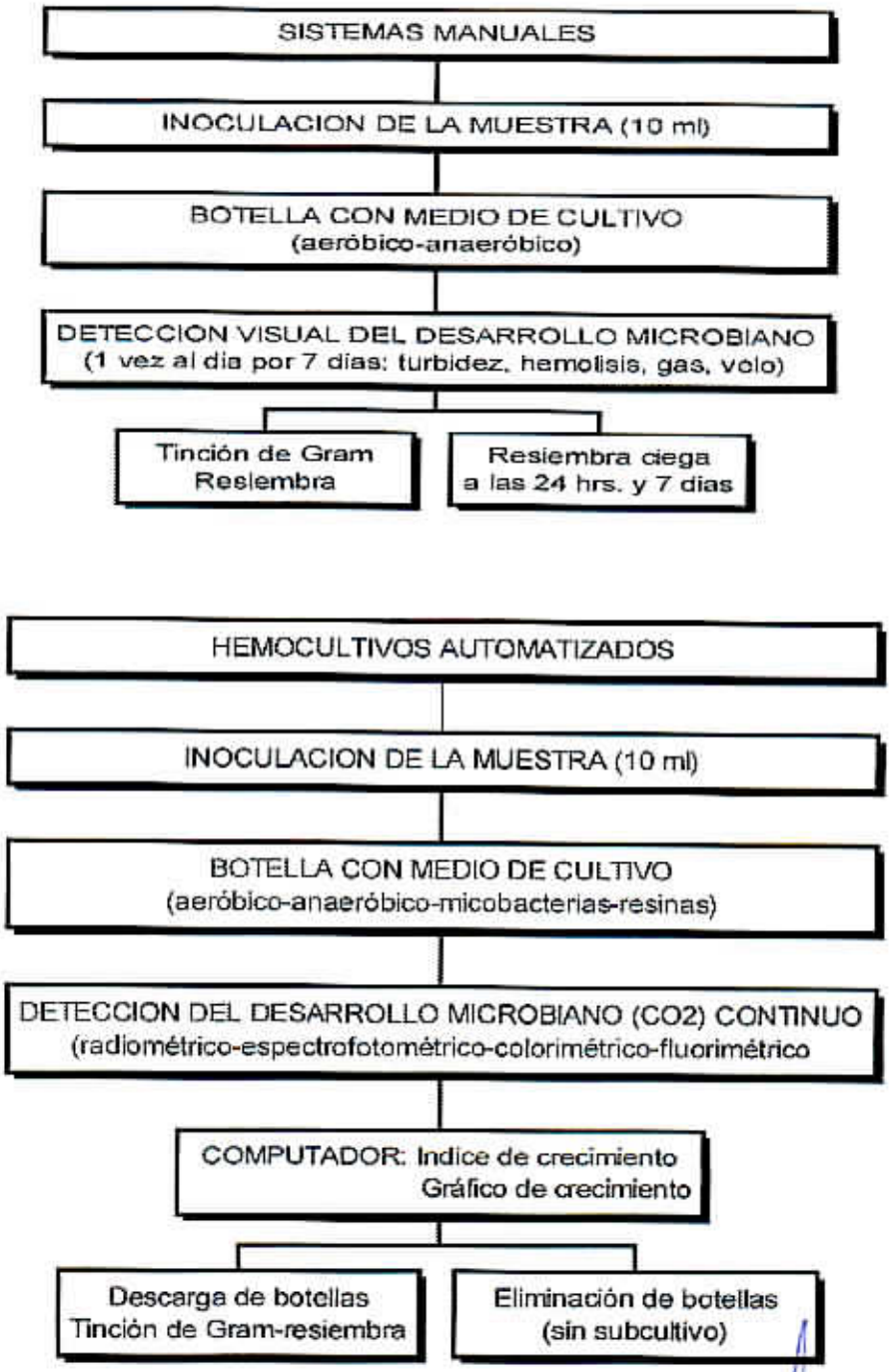
En general existen 3 tipos de sistemas de hemocultivos:

- Manuales o convencionales
- Semi-automatizados: Lisis-centrifugación
- Automatizados

R. RAMOS M
A. ROJAS
A. Calero H

Las diferencias técnicas entre la metodología convencional y los sistemas automatizados se observan en la figura N°2.

Figura N°2: Comparación de los sistemas manuales versus los automatizados



R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H

2.1 SISTEMAS MANUALES

El medio de cultivo debe contener 0,025 a 0,05% de polianetol sulfonato de sodio (SPS) como anticoagulante. Este inhibe la actividad bactericida del suero contra muchas bacterias y la fagocitosis, además inactiva el complemento, neutraliza lisozimas y algunos antibióticos del grupo de aminoglicósidos.

Peptostreptococcus, Gardnerella y algunas cepas de *Neisseria* spp. son inhibidas por el SPS, este efecto puede ser neutralizado suplementando el medio con gelatina 1,2%.

El caldo del hemocultivo debe ser capaz de permitir el crecimiento de cualquier bacteria de importancia clínica.

En los sistemas manuales la elección del medio de cultivo, la temperatura y atmósfera de incubación es decisión del microbiólogo basado en el diagnóstico clínico.

Una desventaja de este sistema con relación al automatizado es el mayor riesgo de contaminación por la manipulación de las botellas al realizar los procedimientos de tinción y traspasos.

2.2 SISTEMAS SEMI AUTOMATIZADOS: LISIS-CENTRIFUGACIÓN

Consiste en un tubo de lisis cuyo contenido es polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante, saponina como agente lítico de eritrocitos, leucocitos y macrófagos, polipropilenglicol como antiespumante y un fluoroquímico inerte de alta densidad. Luego se somete a la muestra a una centrifugación a alta velocidad que permite la concentración de microorganismos en el sedimento que se siembra en medios de cultivo específicos (9,6).

En general, este método permite mejorar en un 25 a 50% la detección de hongos levaduriformes y filamentosos, se considera el método de elección en bacteriemias por Micobacterias (pacientes HIV) y permite realizar hemocultivos cuantitativos que son útiles para diagnóstico de bacteriemia relacionada a Catéter Venoso Central (CVC).

2.3 SISTEMAS AUTOMATIZADOS

Los sistemas automatizados consisten básicamente en botellas con diversos medios de cultivo (aeróbicos, anaeróbicos, hongos, micobacterias y con resinas que captan antibióticos) que se incuban en equipos que agitan constantemente las muestras y que poseen modernos sistemas de detección microbiana. Estos se basan en la detección de productos del metabolismo bacteriano (CO_2) mediante técnicas radiométricas, espectrofotométricas, fluorométricas y/o colorimétricas. El computador asociado a los equipos relaciona las mediciones con índices y/o gráficas de crecimiento microbiano que dan un aviso cuando la detección sobrepasa un punto de corte. Las botellas se descargan, se hace una tinción de Gram y se informan precozmente.

3.0 IMPACTO DE LA AUTOMATIZACIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Castro H.

El impacto de la automatización de los hemocultivos versus la metodología convencional puede ser evaluado desde 4 puntos de vista: clínico, microbiológico, epidemiológico y económico.

3.1 IMPACTO CLÍNICO: La implementación de sistemas automatizados de hemocultivos con monitoreo sensibles y continuos y con agitación constante han llevado a un aumento de la velocidad de detección, con una disminución del tiempo de respuesta y a un aumento de la sensibilidad de los hemocultivos. Esto permite mejorar la capacidad diagnóstica en bacteriemias y un uso más racional de la terapia antimicrobiana (2).

3.2 IMPACTO MICROBIOLÓGICO: Ha sido principalmente una disminución de la carga de trabajo con posibilidades de procesar grandes volúmenes de muestras, una disminución de la contaminación cruzada por técnicas de detección no invasivas y un aumento del espectro de microorganismos que se detectan por estos sistemas.

3.3 IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO: El soporte computacional que poseen estos sistemas permiten obtener listados de positividad por pacientes, por muestra, por microorganismo, conocer el rendimiento (% de positividad) y la contaminación de los hemocultivos. Estos datos se pueden evaluar por servicio, por tipo de muestra, diarios, semanales, mensuales y/o anuales, lo que constituyen gran aporte en el control de las bacteriemias intrahospitalarias.

3.4 IMPACTO ECONÓMICO: A nivel del laboratorio: aumento del costo por botella (2 a 4 veces el costo de la convencional), disminución de las horas/hombre, disminución de los costos del material de resiembra, disminución del riesgo de cortopunzantes en el operador. Esto conduce a una disminución del costo global de los hemocultivos negativos siempre y cuando no se considere el costo del equipo. A nivel del hospital: podría conducir a una disminución de los días de uso de antibióticos de amplio espectro (más caros y con mayor toxicidad) y podría significar también una disminución de los días/cama; sin embargo casi no existen publicaciones que avalen estos impactos.

4.0 TOMA DE LA MUESTRA

4.1 MOMENTO DE LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

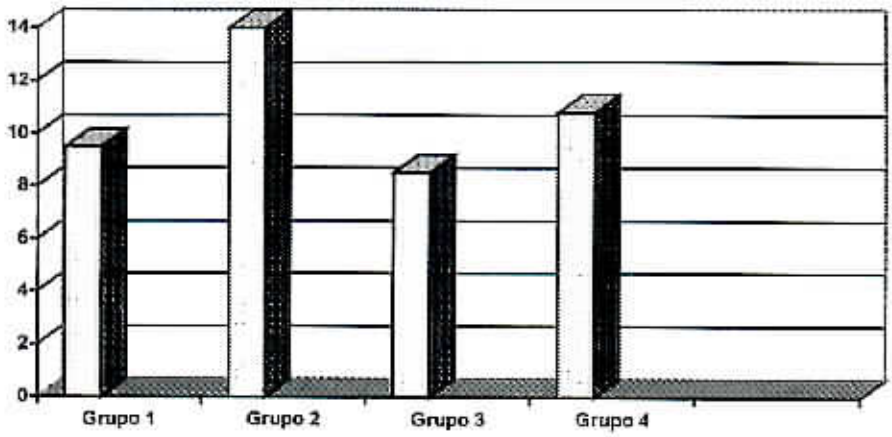
Se ha documentado que el mejor momento para obtener la muestra de sangre es entre 2 horas a 30 minutos antes del peak febril. Thomson y Evans demostraron en 78 episodios de bacteriemia que el porcentaje más alto de positividad (14%) de los hemocultivos era en el grupo de pacientes cuyas muestras se habían obtenido entre 2,5 y 0,5 horas pre-peak en comparación con las muestras obtenidas durante el peak (8%) y las muestras obtenidas entre 12 y 2,5 horas pre-peak o las muestras obtenidas 1 a 12 horas post-peak (34). Por esto el mejor momento sería antes del inicio del peak febril el que puede ser precedido por calofríos (Figura N°3). Sin embargo dado que este momento no se puede predecir, se recomienda en forma arbitraria obtener dos hemocultivos en 24 horas separados por 30 a 90 minutos o bien obtener los dos hemocultivos al mismo tiempo, de diferentes sitios de punción, si se trata de un paciente que va a requerir inicio inmediato de antimicrobianos.

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calero H

Figura N°3: Porcentaje de positividad de los hemocultivos según el momento de la toma de la muestra.



El grupo 1 está constituido por pacientes cuyas muestras se obtuvieron entre 12 a 2,5 horas pre-peak febril. El grupo 2 por pacientes cuyas muestras se obtuvieron entre 2,5 y 0,5 horas pre-peak. El grupo 3, durante el peak y el grupo 4, entre 1 a 12 horas post-peak (25).

4.2 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra debe obtenerse por punción periférica (venosa o arterial), siempre por una nueva punción y debe ser la primera muestra que debe obtenerse si existe indicación de otros exámenes.

La muestra obtenida por catéter venoso central en una muestra inadecuada, ya que estudios de microscopía electrónica han revelado que el 100% de los catéteres se colonizan con microorganismos de la piel a las 48 horas de instalados (25). Por esto, la recuperación de microorganismos en el hemocultivo obtenido a través del catéter puede corresponder al arrastre de las bacterias que están colonizando la superficie interna más que a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, con un aumento de los falsos positivos de 1,7 a 3,8% (10).

4.3 PREPARACIÓN DE LA PIEL

Este aspecto es esencial si se quiere evitar la contaminación de los hemocultivos, ya que en la actualidad con los sistemas automatizados de hemocultivos que evitan la manipulación de los mismos, prácticamente no existe la posibilidad de que los hemocultivos se contaminen en el laboratorio.

Después de la palpación de la vena, la piel debe ser lavada con povidona yodada, lavador quirúrgico, con gluconato de clorhexidina al 2-4% o con agua y jabón. La desinfección de la piel se realiza con povidona yodada, tintura de yodo o con clorhexidina alcohólica, según lo que se haya utilizado como lavador, aplicado en forma excéntrica desde el sitio de punción elegido. Se debe esperar que el antiséptico se seque para que ejerza su acción

R. RAMOS M
A. ROJAS
K. CALVEZ C.
A. C

residual (30). Si se utiliza tintura de yodo, se debe retirar completamente con agua para evitar quemaduras.

Siempre la punción debe ser efectuada con guantes, que deben ser estériles cuando se requiere nuevamente la palpación de la vena.

4.4 VOLUMEN DE LA MUESTRA

Se considera actualmente una de las variables más críticas en el aumento de la positividad de los hemocultivos. Dado que la mayoría de las bacteriemias son de baja magnitud (< 1 a 10 ufc/ml) a mayor volumen de muestra obtenido, mayor es la sensibilidad del hemocultivo. Se sabe que por cada ml adicional de muestra que se inocule en la botella aumenta la positividad entre un 2 a 5%. Recientemente, en un estudio pareado, Mermel y Maki (20) demostraron una disminución significativa ($p<0.001$) de la positividad de los hemocultivos cuando se obtenían en promedio 2,7 ml (69%) versus 8,7 ml (92%).

Por esto es que las recomendaciones son obtener el máximo de volumen que la botella sea capaz de tolerar manteniendo la relación 1:5 a 1:10 entre la muestra y el volumen de medio de cultivo, esta dilución permite neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre y de los agentes antibacterianos que puedan estar presentes en la muestra. Para la gran mayoría de los sistemas automatizados este volumen es de 10 ml para adultos y es variable para los niños según la edad: 1 a 2 ml para recién nacidos, 2 a 3 ml para lactantes de 1 mes a 2 años, 3 a 5 ml para niños mayores de 2 años y 10 ml para adolescentes.

4.5 INOCULACIÓN DE LAS BOTELLAS

En el caso de los sistemas automatizados, se debe descontaminar el tapón de goma antes de puncionar la botella con alcohol y esperar que se seque, ya que el fabricante no garantiza la esterilidad de éste. Existen controversias respecto al cambio de aguja antes de inocular la muestra en la botella, sin embargo un meta-análisis reciente demuestra que el cambio de aguja disminuye el porcentaje de contaminación (33). En el caso de los sistemas manuales que no son sellados, se debe destapar el frasco para inocular la muestra. Este procedimiento tiene riesgo de contaminación por lo que se debe tener máxima precaución en no tocar las paredes exteriores de la botella con la aguja.

4.6 NÚMERO DE LOS HEMOCULTIVOS

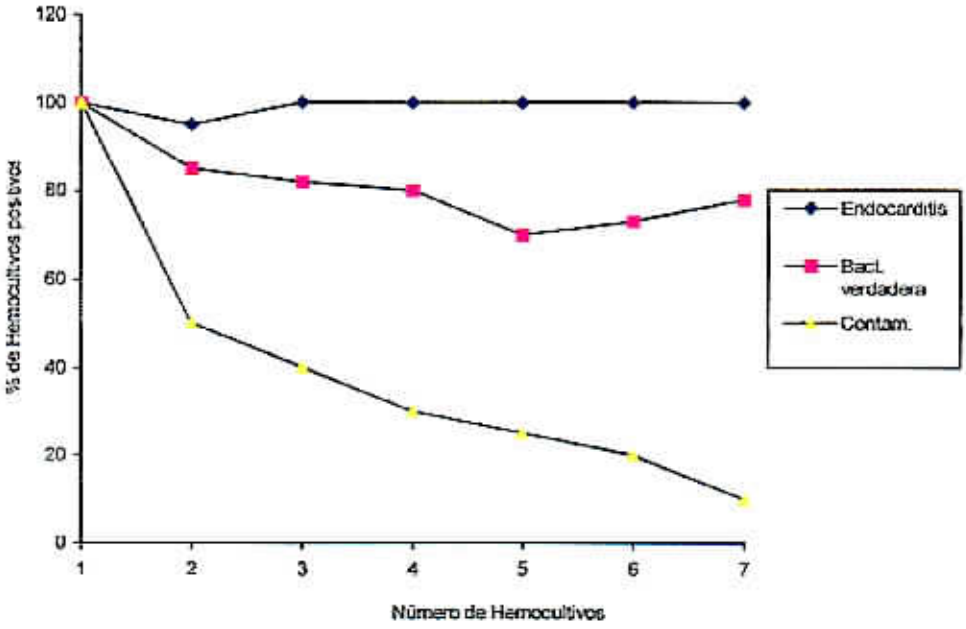
La recomendación general es obtener dos hemocultivos en un período de 24 horas. Para sistemas manuales, Weinstein en 1983 encontró que en un episodio bacteriémico la positividad de uno, dos y tres hemocultivos fue de 91%, 98% y 99% respectivamente (35). El mismo autor con sistemas automatizados en 1994, encontró que en 218 pacientes bacteriémicos, el tercer hemocultivo fue el único positivo sólo en 6 pacientes, de los cuales sólo en uno correspondió a una bacteriemia verdadera (36). La obtención de 2 hemocultivos en 24 horas, no sólo aumenta la probabilidad de recuperar las bacterias a partir de la sangre sino que también permite diferenciar una bacteriemia verdadera de una contaminación.

R. RAMOS M. A. ROJAS A. Pablo H.

Si se sospecha endocarditis infecciosa, se recomienda obtener el primer set de 2 hemocultivos y si estos van negativos en las primeras 24 horas, obtener un segundo set de 2 hemocultivos más.

En ningún caso se recomienda la obtención de sólo un hemocultivo y en el último tiempo se ha considerado la evaluación de los hemocultivos solitarios (únicos) como un instrumento para evaluar el control de calidad en microbiología (29).

Figura N°4: Evidencia de la importancia de obtener a lo menos 2 a 3 hemocultivos. Cuando 2 o 3 hemocultivos de una serie son positivos, es altamente improbable que se trate de una contaminación.



R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Claro H.

residual (30). Si se utiliza tintura de yodo, se debe retirar completamente con agua para evitar quemaduras.

Siempre la punción debe ser efectuada con guantes, que deben ser estériles cuando se requiere nuevamente la palpación de la vena.

4.4 VOLUMEN DE LA MUESTRA

Se considera actualmente una de las variables más críticas en el aumento de la positividad de los hemocultivos. Dado que la mayoría de las bacteriemias son de baja magnitud (< 1 a 10 ufc/ml) a mayor volumen de muestra obtenido, mayor es la sensibilidad del hemocultivo. Se sabe que por cada ml adicional de muestra que se inocule en la botella aumenta la positividad entre un 2 a 5%. Recientemente, en un estudio pareado, Mermel y Maki (20) demostraron una disminución significativa ($p<0.001$) de la positividad de los hemocultivos cuando se obtenían en promedio 2,7 ml (69%) versus 8,7 ml (92%).

Por esto es que las recomendaciones son obtener el máximo de volumen que la botella sea capaz de tolerar manteniendo la relación 1:5 a 1:10 entre la muestra y el volumen de medio de cultivo, esta dilución permite neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre y de los agentes antibacterianos que puedan estar presentes en la muestra. Para la gran mayoría de los sistemas automatizados este volumen es de 10 ml para adultos y es variable para los niños según la edad: 1 a 2 ml para recién nacidos, 2 a 3 ml para lactantes de 1 mes a 2 años, 3 a 5 ml para niños mayores de 2 años y 10 ml para adolescentes.

4.5 INOCULACIÓN DE LAS BOTELLAS

En el caso de los sistemas automatizados, se debe descontaminar el tapón de goma antes de puncionar la botella con alcohol y esperar que se seque, ya que el fabricante no garantiza la esterilidad de éste. Existen controversias respecto al cambio de aguja antes de inocular la muestra en la botella, sin embargo un meta-análisis reciente demuestra que el cambio de aguja disminuye el porcentaje de contaminación (33). En el caso de los sistemas manuales que no son sellados, se debe destapar el frasco para inocular la muestra. Este procedimiento tiene riesgo de contaminación por lo que se debe tener máxima precaución en no tocar las paredes exteriores de la botella con la aguja.

4.6 NÚMERO DE LOS HEMOCULTIVOS

La recomendación general es obtener dos hemocultivos en un período de 24 horas. Para sistemas manuales, Weinstein en 1983 encontró que en un episodio bacteriémico la positividad de uno, dos y tres hemocultivos fue de 91%, 98% y 99% respectivamente (35). El mismo autor con sistemas automatizados en 1994, encontró que en 218 pacientes bacteriémicos, el tercer hemocultivo fue el único positivo sólo en 6 pacientes, de los cuales sólo en uno correspondió a una bacteriemia verdadera (36). La obtención de 2 hemocultivos en 24 horas, no sólo aumenta la probabilidad de recuperar las bacterias a partir de la sangre sino que también permite diferenciar una bacteriemia verdadera de una contaminación.

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Cabrera H.

b.- Observar diariamente el aspecto macroscópico en busca de signos que indiquen desarrollo bacteriano: hemólisis, turbidez, presencia de gas, colonias, etc. (Tabla N°2). En ese momento hacer tinción de Gram directo de la siguiente forma: homogeneizar el contenido del frasco de hemocultivo por agitación suave, colocar una gota en el extremo del porta objeto y extender con un cubre objeto en ángulo 45°. Subcultivar a una placa de agar chocolate suplementado y a una placa de agar sangre de cordero al 5%.(Tabla N°3).
c.- Realizar subcultivos ciegos aunque no se observen evidencias de desarrollo a las 24 horas y al 7° día de incubación, independientemente del aspecto macroscópico que presente la botella.
d.- Observar características macroscópicas de las colonias y hacer tinción de Gram directo.
e.- Efectuar las pruebas bioquímicas y estudio de susceptibilidad antimicrobiana que corresponda al tipo de aislamiento.

Algunos medios usados para hemocultivo son: Caldo cerebro corazón, caldo Brucella, caldo Columbia, caldo peptonado suplementado, caldo soya tripticasa.

6.2. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS

En sospecha de Brucelosis incubar hasta 30 días en atmósfera con 5-10% CO_2.

Para hemocultivos anaeróbicos si se utilizan medios comerciales específicos, incubar en atmósfera normal por 7 días.

Los cultivos para *Leptospira* deben incubarse en oscuridad a 28-29°C por 4-6 semanas, el medio de cultivo es un medio enriquecido que consiste en un caldo adicionado de suero de conejo.

Otros medios son:
a.- Sistema bifásico (*Brucella* spp.)
b.- Medios específicos para anaerobios: Caldo Tioglicolato,
c.- Medios específicos para aislamiento de hongos.
d.- Medios específicos para aislamiento de micobacterias.

6.2.1 *Streptococcus* NUTRICIO-DEFICIENTES

Algunas cepas de *Streptococcus viridans* son dependientes de Piridoxal para su crecimiento. Al parecer el Piridoxal (vitamina B_6) presente en la sangre humana permite el desarrollo de estos microorganismos en el medio de hemocultivo, pero como este elemento no se encuentra presente en los medios en que se realiza el subcultivo, estos deben ser suplementados con Piridoxal al 0,001%, o L-cisteina al 0,05-0.1% o ambos.

Se debe sospechar la presencia de estos microorganismos cuando se observan al Gram la presencia de cocáceas y no se obtiene desarrollo en los subcultivos en diferentes atmósferas (aerobio-anaerobio).
a.- Subcultivar hemocultivos positivos en agar sangre cordero al 5% suplementado con Piridoxal al 0,001% o L-cisteina.
b- Sembrar cruzando la superficie del agar con *Staphylococcus aureus* e incubar 18 hrs. a 35°C.
c.- Observar la presencia de pequeñas colonias satélites alrededor de *S. aureus*.

R. RAMOS M A. ROJAS A. COLLO H

Métodos alternativos.

a.- Inocular una placa de agar sangre con varias gotas del medio suplementado que contiene el microorganismo sospechoso.

b.- Colocar asépticamente un disco de Piridoxal (catálogo Remel N°21-137) en el área con mayor inoculo.

c.- Incubar la placa por 18 hrs. a 35°C.

d.- Observar la presencia de colonias satélites alrededor del disco.

6.2.2 MICROORGANISMOS DE PARED DEFICIENTE

Se sospecha frente a un paciente con endocarditis bacteriana que presenta hemocultivos negativos. Para efectuar el aislamiento se recomienda incorporar al medio de cultivo sacarosa o manitol al 10%.

6.3 EXAMEN DE LOS CULTIVOS

6.3.1 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

TABLA N°2. Microorganismos asociados al aspecto macroscópico de hemocultivos

Aspecto macroscópico	Microorganismo asociado
Hemólisis	*Streptococcus, Staphylococcus, Listeria* spp. *Clostridium, Bacillus* spp.
Turbidez	Bacilo gramnegativo aerobio, *Staphylococcus, Bacteroides* spp.
Formación de gas	Bacilo gramnegativo aerobio, anaerobios
Formación de velo	*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., levaduras
Coágulo	*Staphylococcus aureus*
Colonias visibles (puntiformes)	*Staphylococcus, Streptococcus*

6.3.2 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DEPENDIENDO DE LA TINCIÓN DE GRAM

TABLA N°3. Medios de cultivo utilizados, según tinción de Gram

Gram	AS	Ch	Mac	CNA	Ana	Bruc *.
Cocacea grampositiva		x		x	x	x
Bacilo grampositivo	x	x		x	x	
Cocacea gramnegativa		x	x	x	x	x
Bacilo gramnegativo	x	x	x		x	

* AS=agar sangre; Ch=agar chocolate, Mac= agar Mac Conkey, CNA= agar Columbia-colistin-ácido nalidixico, Ana=agar anaerobio, Bruc=Agar Brucella.

R RAMOS M

A ROJAS

7.0 IMPORTANCIA DEL HEMOCULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE MICROORGANISMOS ESPECIALES

7.1 HEMOCULTIVOS ANAEROBIOS

En la mayoría de los centros hospitalarios se ha observado una disminución en el número de aislamiento de anaerobios, con un aumento de hongos y bacterias fastidiosas (7). Probablemente los factores que han contribuido a la disminución en la recuperación de bacterias anaerobias han sido el uso de profilaxis antimicrobiana pre-operatoria y el uso de terapia empírica de amplio espectro que cubre bien los anaerobios.

Por la reducción en la tasa de aislamiento de anaerobios se ha recomendado obtener en forma rutinaria 2 hemocultivos aeróbicos y reservar la obtención de hemocultivos anaeróbicos cuando los datos clínicos sugieran una infección por anaerobios: infección intraabdominal, infección pelviana, etc. (28).

7.2 HEMOCULTIVOS CON REMOCIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS (RESINAS)

El objetivo de estos productos que se agregan al medio de cultivo, es la remoción de los antibióticos, para aumentar la recuperación de bacterias en pacientes que están recibiendo terapia antimicrobiana.

Aunque en general, las botella que contienen estos productos han mostrado un aumento en la tasa de recuperación bacteriana (19), el mecanismo no parece relacionarse a la captación o inhibición del antibiótico ya que además pueden influir otras variables como el aumento de volumen de la muestra o la utilización de un medio de cultivo más enriquecido.

Ambos sistemas (BacT/Alert y BACTEC) disponen en la actualidad de botellas con remoción de agentes antimicrobianos y se ha demostrado una mayor recuperación de bacterias patógenas (37), sin embargo en la elección del sistema, debe considerarse el alto costo de la botella.

7.3 HEMOCULTIVOS PARA MICROORGANISMOS ESPECIALES

7.3 1 Micobacterias

En general *Mycobacterium tuberculosis* cursa con cortos períodos de bacilemia aún en pacientes con SIDA por lo que su recuperación a partir de una muestra de sangre es menos frecuente que *M. avium- intracelullare* y otras micobacterias no tuberculosas.

El método de lisis-centrifugación ha sido el método más ampliamente utilizado, ya que las micobacterias son microorganismos intracelulares y la lisis celular permite la liberación de las micobacterias lo que favorece su desarrollo, sin embargo es un método laborioso que requiere manipulación de la muestra y resiembra en medios para micobacterias (18).

En BACTEC™ 13A radiométrico (Becton Dickinson) se puede inocular la muestra directamente en la botella del hemocultivo sin un procesamiento previo. El tiempo de detección depende de la concentración de *Mycobacterium* en la sangre y de la especie de *Mycobacterium* que produce la infección (15). La reciente introducción de botellas para sangre

R. RAMOS M

A. ROJAS

A. Calderón H

en el sistema BACTECMYCO/F Lytic ® (Becton Dickinson) ha mostrado resultados comparables con los de lisis-centrifugación (11).

7.3.2 Hongos

Las fungemias constituyen una infección cada vez más frecuente principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

En la actualidad el método de elección es el de lisis-centrifugación que recupera levaduras y hongos dimórficos. Sin embargo las levaduras también se recuperan a partir de sistemas automatizados de hemocultivos, pero requieren subcultivo en medios adecuados y una incubación prolongada (12).

7.3.3 *Brucella* spp.

Los sistemas automatizados disponibles en la actualidad permiten una buena recuperación de *Brucella*. También lisis-centrifugación es un método de elección que recupera *Brucella* mejor que el tradicional método de Castañeda.

Es necesario en los casos en que existe la sospecha clínica de *Brucella*, que la muestra se incube más de 7 días y en el caso de los sistemas automatizados, se recomienda el subcultivo ciego terminal a los 7 y 14 días (32).

7.3.4 *Campylobacter* spp.

Se recupera bien a partir de los sistemas automatizados y por lisis-centrifugación, sin embargo el subcultivo debe ser en medios suplementados para lograr el aislamiento del microorganismo e incubados a la temperatura y atmósfera que requiere esta bacteria fastidiosa (32).

7.3.5 *Legionella* spp.

Hay pocos casos descritos de bacteremia por *Legionella*. En sistemas automatizados se requieren los subcultivos terminales ciegos en medios de cultivos suplementados (39).

7.3.6 HACEK

El término HACEK es un acrónimo para un grupo de bacilos gram negativos fastidiosos que incluyen a *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*.

Estas bacterias se recuperan en hemocultivos de pacientes con endocarditis infecciosa, aunque pueden aislarse a partir de otros focos infecciosos. Las recomendaciones para los hemocultivos en que exista la sospecha clínica de infección por HACEK son: Mantener la incubación inicial por 7 a 14 días y efectuar subcultivo terminal a los 7 y 14 días (39)

R. RAMOS M.

A. ROJAS

A. Cadero H.

7.3.7 Bartonella henselae

Agente etiológico de la angiomatosis bacilar en pacientes con SIDA y de la enfermedad por arañazo de gato.

El método recomendado para su aislamiento en sangre es el de lisis-centrifugación con cultivo del sedimento en agar sangre de cordero con atmósfera de 5 % de CO_2 por un período de incubación de al menos 7 días (39)

8.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

8.1 DIFERENCIACIÓN DE BACTEREMIA VERDADERA VERSUS CONTAMINACIÓN

No todos los hemocultivos positivos son clínicamente significativos. Se acepta un porcentaje de contaminación que varía entre un 2 a 3% y representa costos muy altos para las instituciones y los pacientes. Esta contaminación se atribuye principalmente a una contaminación durante la toma de la muestra, ya que con los sistemas de hemocultivos automatizados, la posibilidad que se contaminen en el laboratorio es remota. En la actualidad, la tasa de contaminación de los hemocultivos, constituye un indicador de calidad (13).

Se han propuesto algunas recomendaciones que permiten predecir una bacteriemia verdadera, sin embargo la decisión final de la significancia clínica de un hemocultivo positivo, depende en última instancia de la presentación clínica y del curso de la enfermedad en un paciente determinado.

8.1.1 TIPO DE MICROORGANISMO

Cuando el microorganismo aislado corresponde a flora de la piel, es necesario diferenciar si se trata de una bacteriemia verdadera o de una contaminación.

Clásicamente se ha establecido que un 94% (153/163) de *Staphylococcus* coagulasa negativo aislados de un sólo hemocultivo, corresponden a contaminaciones. Lo mismo ocurre en el 94 % (17/18) de *Bacillus* spp., 99% (73/74) de *Propionibacterium acnes*, 79% (26/33) de *Corynebacterium* spp., 50% (8/16) de *Clostridium perfringens* y 48% (12/25) de *Streptococcus viridans* . Sin embargo, estos pueden ser considerados patógenos cuando se aíslan en hemocultivos múltiples, cuando corresponden a pacientes inmunosuprimidos o a pacientes portadores de dispositivos protésicos como catéteres venosos centrales, prótesis ortopédicas, prótesis vasculares o válvulas de derivación ventrículo-peritoneal (27).

En la actualidad *Staphylococcus* coagulasa negativo es la principal causa de bacteriemia intrahospitalaria y la mayoría de las veces se relaciona al uso de catéteres venosos centrales (16).

8.1.2 HEMOCULTIVOS POSITIVOS MÚLTIPLES AL MISMO MICROORGANISMO (Fig. N° 3)

Se considera como bacteriemia verdadera cuando se aísla el mismo microorganismo en varios hemocultivos, aunque sean microorganismos de la piel. Sin

R. RAMOS M.

K. ROJAS

K. GUEVEZ C.

A. Calero H.

embargo, se debe considerar que el valor predictivo positivo de aislar *Staphylococcus* coagulasa negativo en hemocultivos, está aumentando, llegando a ser de 26% en una población de alto riesgo: transplantes de médula ósea, neoplasias hematológicas y pacientes multi-invadidos en unidades de cuidados intensivos. Además un 26% de los pacientes con bacteriemia verdadera por *Staphylococcus* coagulasa negativo diagnosticada por criterios clínicos objetivos, tenían sólo un hemocultivo positivo (14).

8.1.3 TIEMPO DE INTERVALO HASTA LA POSITIVIDAD

En general los contaminantes, por encontrarse en bajo número, requieren un tiempo de incubación prolongada (16). Sin embargo, esta variable no puede ser considerada por sí sola como predictor de contaminación o bacteriemia verdadera.

8.1.4 HEMOCULTIVOS POSITIVOS MÁS UN CULTIVO DE SITIO ESTÉRIL POSITIVO PARA EL MISMO MICROORGANISMO

Este es uno de los criterios que se utiliza para el diagnóstico confirmado de bacteriemia relacionada a catéter venoso central, cuando en la punta del catéter se aísla en un recuento significativo (<15 ufc) el mismo microorganismo que en el hemocultivo (21).

8.2 HEMOCULTIVOS OBTENIDOS A TRAVES DE CATETERES VENOSOS CENTRALES

En la actualidad el método recomendado para el diagnóstico de infección relacionado a catéteres venosos centrales, sin retiro del mismo, son los hemocultivos cuantitativos (21), que consiste en la comparación entre los recuentos obtenidos por sangre periférica y de sangre por el catéter. Se acepta que un de 5-10 veces más en la sangre por catéter que en la periferia tiene un alto valor predictivo para bacteriemia relacionada al CVC (19, 20)(41,24).

Recientemente se ha descrito que los diferentes tiempos de incubación en sistemas automatizados entre las muestras de sangre obtenida por el catéter y sangre obtenida por punción periférica, podrían ser de utilidad en el diagnóstico de bacteriemia relacionada a catéter (5,17).

8.3 INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LOS RESULTADOS DE HEMOCULTIVOS

La presencia de un hemocultivo positivo debe interpretarse a la luz del cuadro clínico, el agente aislado y el número de cultivos positivos, para así decidir cuan significativo puede ser un resultado determinado. Cuando se aísla agentes como *S. aureus*, Enterobacterias, *S. pneumoniae*, Micobacterias u hongos levaduriformes, la probabilidad de que representen una infección verdadera es mayor al 90%. En cambio agentes tales como *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. o *Propionibacterium acnes* no constituyen una bacteriemia verdadera en la gran mayoría de los casos (38). La diferenciación de bacteriemia verdadera versus contaminación para el caso de los *Staphylococcus* coagulasa negativa, ya ha sido analizada en un párrafo anterior.

R. RAMOS M

A. ROJAS

JEFATURA

K. GALVEZ C.

Cuando asistimos a la presencia de bacteriemias por más de un agente, deberemos utilizar los mismos criterios antes mencionados para cada microorganismo aislado, para asi decidir si constituyen o no verdaderos patógenos. En situaciones tales como abscesos intraabdominales, infecciones de catéteres, neutropénicos febriles con mucositis intensa o grandes quemados, no es infrecuente aislar más de un agente en hemocultivos. Sin embargo en la gran mayoría de las situaciones clínicas, las bacteriemias o fungemias son por un microorganismo único.

Por último en un cuarto a un tercio de los episodios de bacteriemia, no existe un foco clínico evidente (26), lo cual obligará a la búsqueda de sistemática de la fuente de infección. Ello es muy importante, por la necesidad de planificar la duración del tratamiento (ej. Endocarditis infecciosa) y también para determinar si existen focos supurados que requieran de procedimientos de drenaje adicionales a la terapia antimicrobiana.

9.0 INFORME DE RESULTADOS

9.1 PREINFORME

Informar de inmediato al médico si se observan bacterias al Gram, indicando: cantidad, morfología y agrupación. Si dispone de sistemas automatizado, informe las horas transcurridas hasta la positividad.

9.2 INFORME DEFINITIVO

Indicar el período de incubación durante el cual no se observó desarrollo cuando se emite un informe negativo.

Para un hemocultivo positivo informar el microorganismo identificado con su respectiva susceptibilidad a antimicrobianos cuando corresponda.

Se debe notificar al clínico todos los resultados, incluidos los presuntos contaminantes.

10.0 ENVÍO AL LABORATORIO DE REFERENCIA

Enviar al Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública en caso de aislamiento de bacterias como: *Salmonella* spp., *Brucella*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* provenientes de cuadros invasores, *Haemophilus influenzae*, *Leptospira* (solo muestras de suero), para confirmación y vigilancia epidemiológica de acuerdo a lo indicado en el reglamento N° 712 sobre notificación de enfermedades transmisibles.

11.0 REFERENCIAS

1. Anuario de Notificación Obligatoria.1992. Ministerio de Salud.Chile.
2. Arbo MD; Snydman DR. Influence of blood culture results on antibiotic choice in the treatment of bacteremia. Arch. Intern. Med. 1994;154:2641-2645.

R. RAMOS M

A. ROJAS

JEFATURA

3. Bates DW., Cook EF., Goldman L and Lee TH. Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospective validated model. Ann Int. Med. 1990;113:495-500

4. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. WHO. 1991.

5. Blot F; Schmidt E; Nitenberg G, Tancrede C; Leclercq; Laplanche A, et al. Earlier positivity of central -venous-versus peripheral-blood culture is highly predictive of catheter-related sepsis. J. Clin. Microbiol. 1998;36:105-109.

6. Brannon P, Kiehn TE. Large-scale clinical comparison of the lysis-centrifugation and radiometric systems for blood culture. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 951-954.

7. Chandrasekar PH, Brown WJ. Clinical Issues of blood cultures. Arch. Intern. Med. 1994; 154:841-849.

8. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 1, 1993.

9. Dorn GL, Smith K. New centrifugation blood culture device. J. Clin. Microbiol. 1978;7:52-54.

10. Everts RJ; Vinson EN; Adholla PO; Reller BL. Contamination of catheter-drawn blood cultures. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3393-3394.

11. Fuller DD, Davis TE Jr, Denys GA, York MK. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic medium for recovery of mycobacteria, fungi, and bacteria from blood. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2933-2936.

12. Geha DJ, Roberts GD. Laboratory detection of fungemia. Clin. Lab. Med. 1994;14:83-97.

13. Gibb AP Hill B, Chorel B et al. Reduction in blood culture contamination rate by feedback to phlebotomists. Arch. Pathol. Lab. Med .1997; 121:503-507.

14. Herwaldt LA, Geiss M et al. The positive value of isolating coagulase-negative Staphylococci from blood cultures. Clin. Infect. Dis. 1996;22:14-20.

15. Kiehn TE, Cammarata R. Comparative recoveries of Mycobacterium avium-M. intracellulare from Isolator Lysis-centrifugation and BACTEC 13A Blood culture systems.

16. Kloos WE, Bannerman TL. Update on Clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. 1994;7:117-140.

17. Malgrange VB; Escande MC; Theobald S. Validity of earlier positivity of central venous blood cultures in comparison with peripheral blood cultures for diagnosing catheter-related bacteremia in cancer patients.

18. Macher AM, Kovacs JA et al. Bacteremia due to Mycobacterium avium-intracellulare in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. 1983; 99:782-785.

19. Mc Donald LC, Fune LB, et al. Clinical importance of increased sensitivity of BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture botlles. J. Clin. Microbiol. 1996; 34:2180-2184.

20. Mermel LA, maki DG. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. Ann. Intern. Med. 1993;119:270-272.

21. Mermel LA; Farr BM; Sherertz RJ; Raad II; O'Grady N; Harris JS; Craven DE. Guidelines for the managements of intravascular catheter-related infections. Clin. Infect. Dis. 2001; 32:1249-1272.

R. RAMOS M

A. ROJAS

JEFATURA

A. Alcalde H.

22. Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Yolken. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C. ASM, 1999.

23. Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico. Vol. I ISP 1994.

24. Raucher H, Hyatt AC, Barzilai A. Quantitative blood culture in the evaluation of septicemia in children with broviac catheters. J. Pediatr. 1984; 104:29-33.

25. Raad I, Costerton W, et al. Ultraestructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. J ID1993;168:400-407

26. Reimer LG., Wilson ML and Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin. Microbiol. Rev. 1997;10:444-465.

27. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative Staphylococci: Pathogen associated with medical progress.Clin. Infect. Dis.1994;19:231-245.

28. Ryan MR, Murray PR. Laboratory detection of anacrobic bacteremia. Clin. Lab. Med. 1994;14:107-117.

29. Schifman RB, Bachner P, Howanitz PJ. Blood culture quality improvement. A College of American Pathologist Q-Probes study involving 90 institutions and 289.572 blood culture set. Arch. Pathol. Lab. Med. 1996;120: 999-1002.

30. Shifman RB, Pindur A. The effect of skin desinfection materials on reducing blood culture contamination. Am J. Clin. Pathol. 1991;99:536-538.

31. Smith-Elekes S, Wenstein MP. Blood Culture. Infect Dis Clin North Am.1993; 7:221-233.

32. Solomon HM, Jackson D. Rapid Diagnosis of Brucella melitensis in blood: some operational characteristics of the BacT/Alert. J. Clin. Microbiol. 1992;30:222-224.

33. Spitalnic SJ, Woolard RH, Mermel LA. The significance of changing needles when inoculating blood culture: a meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 1995;21:1103-1106.

34. Washington JA. Collection, transport and procesing of blood culture. Clin. Lab. Med. 1994; 14:59-68.

35. Weinstein MP; Reller LB; Murphy JR Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood culture: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. Rev. Infect. Dis. 1983;5:35-53.

36. Weinstein MP; Joho KL; Quartey SM. Assessment of the third blood culture bottle: Does it increase detection of bacteremia? 94th General Meeting of the American Society for Microbiolgy. Las Vegas Mayo 23-28, 1994.

37. Weinstein MP, Mirret S, Reimer ML, et al. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture for the detection of bacteremia and fungemia. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:978-981.

38. Weisntein MP., Towns ML., Quartey SM et al. 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.

R. RAMOS M

A. ROJAS

39. Wilson ML, Mirret S. Recovery of selet rare and fastidious microorganisms from blood culture. Clin. Lab. Med. 1994;14:119-131.

40. Wilson ML, Weinstein MP. Reller LB. Automated blood culture systems. Clin. Lab. Med. 1994;14:149-169.

41. Yagupsky p, Nolte F. Quantitative aspect of septicemia. Clin.Microbiol.Rev. 1990; 3:269

A. ROJAS

JEFATURA

A. Ca