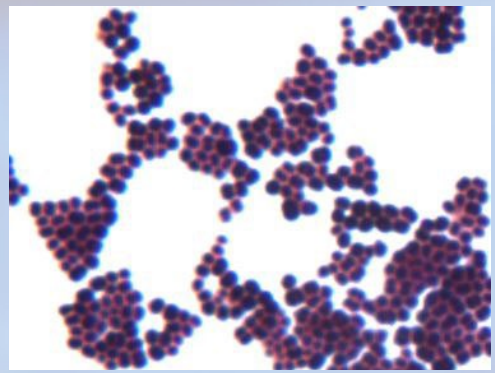
Hemocultivos
Diagnóstico de bacteriemias



Luis Sáenz Mateos
R4 Análisis Clínicos

22 Enero 2013

- 1. Bacteriemia
- 2. Indicaciones de los hemocultivos
- 3. Obtención de la muestra de sangre
- 4. Transporte del hemocultivo al laboratorio
- 5. Recepción y registro de los hemocultivos
- 6. Procesamiento de los hemocultivos
- 7. Interpretación de los resultados

1. Bacteriemia

- Se define como la presencia de bacterias en la sangre se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos.

- Tiene importancia diagnóstica y pronóstica, ya que se asocia con una elevada mortalidad, que oscila entre el 20 y el 50%.

1. Bacteriemia

- Los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos.
- Origen→
  - Foco infeccioso extravascular
    - A través de los capilares sanguíneos o de los vasos linfáticos
  - Foco intravascular
    - Endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales.

1. Bacteriemia

- Los focos más frecuentes:
  - El tracto genitourinario.
  - Los abscesos.
  - Las heridas quirúrgicas.
  - El tracto biliar.
  - Los catéteres intravasculares.
  - En un 25% de los casos su foco originario es desconocido.

1. Bacteriemia

- La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente circulatorio.
- Los grampositivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los gramnegativos. Esto ocurre por:
  - La utilización de antibióticos de amplio espectro.
  - Uso generalizado de catéteres intravasculares.
  - Empleo de métodos de diagnóstico invasores.

1. Bacteriemia

- El diagnóstico definitivo de la bacteriemia se establece al aislar el microorganismo causal en la sangre.

- Nos va a permitir
  - Conocer su sensibilidad a los antimicrobianos.
  - Instaurar el tratamiento
  - Realizar las modificaciones necesarias a la terapia empírica ya establecida.

2. Indicaciones de los hemocultivos

- Deben extraerse las muestras antes de la administración de la terapia antimicrobiana sistémica, siempre que exista sospecha clínica de:
  - Sepsis
  - Meningitis
  - Osteomielitis
  - Pielonefritis
  - Infección intraabdominal
  - Artritis
  - Infecciones graves de la piel y tejidos blandos
  - Neumonía
  - Endocarditis
  - Fiebre de origen desconocido (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, tularemia)

3. Obtención de la muestra de sangre

- Después del comienzo de la fiebre y los escalofríos.
- Siempre que se sospeche una infección grave.
- Si Bacteriemia continua→endocarditis, Brucella o infecciones intravasculares.

Momento de extracción indiferente

- Si bacteriemia intermitente→ocurre en diferentes infecciones o bacteriemias transitorias después de manipulaciones en superficies mucosas no estériles (procedimientos dentales o urológicos, endoscopias), en tejidos infectados (abscesos, forúnculos, celulitis) o en cirugía de áreas contaminadas.

La muestra de sangre debe extraerse lo más cerca posible del pico febril

3. Obtención de la muestra de sangre

- La muestra debe extraerse de una vena
- Generalmente del antebrazo
- La utilización de sangre arterial no ha demostrado ventajas sobre la venosa
- La extracción no debe realizarse a través de catéteres intravenosos o intaarteriales, salvo en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter
- Cada muestra de sangre se obtendrá de lugares de venopunción diferentes

3. Obtención de la muestra de sangre

- Es importante la asepsia de la piel
- Se limpia la zona con alcohol isopropílico o etílico de 70º durante 30 segundos.
- Se aplica solución yodada (tintura de yodo al 1-2% durante 30 segundos o povidona yodada al 10% durante 1 minuto) cubriendo un área circular de 2-4 cm de diámetro.
- Se deja secar y se evita:
- Contacto con los dedos en el lugar de la venopunción
- Hablar y toser mientras se realiza la extracción

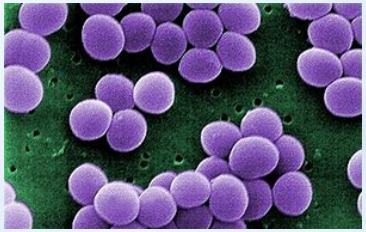
3. Obtención de la muestra de sangre

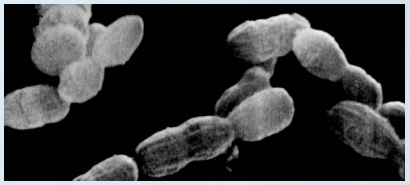
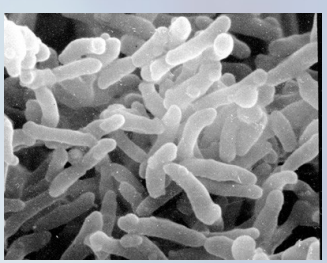
Inmunodeprimidos

Catéteres

- Microbiota de la piel
- *Staphylococcus coagulasa negativa*
- *Bacillus spp.*
- *Propionibacterium acnes*
- *Corynebacterium spp*

Contaminantes



Siempre que su presencia no se repita en más de una muestra por paciente

3. Obtención de la muestra de sangre

- Se limpian los tapones de los frascos de hemocultivo con un antiséptico y se deja secar.
- Se inserta la aguja en la vena elegida y se extrae el volumen de sangre sin utilizar anticoagulante.
- No poner algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de sacarla de la vena.
- Se inocula en primer lugar el frasco anaerobio, evitando la entrada de aire, seguido del aerobio, invirtiéndolos varias veces para mezclar la sangre y el medio de cultivo.

3. Obtención de la muestra de sangre

- Número de extracciones:
- Se considera **una extracción** para hemocultivo, a la sangre extraída de una **única venopunción**, independientemente de los frascos en los que sea inoculada, habitualmente dos (aerobio y anaerobio).

- Para detectar el 95% de las bacteriemias
  - **2 a 3 extracciones** en lugares **diferentes**.

3. Obtención de la muestra de sangre

- Volumen recomendado en adultos
  - 10 ml
  - El índice de positividad aumenta entre el 3-5% /mL
- No es recomendable aumentar el volumen
  - Provoca anemia en el paciente
  - Mantener la proporción de volumen sangre/medio de cultivo
- Neonatos y niños
  - Hay bacteriemias positivas con volúmenes inferiores a 1 ml
  - Volumen debe ser proporcional al peso (al volumen de sangre total) y a la edad
  - 4,5% del volumen total de sangre del paciente pediátrico

4. Transporte del hemocultivo al laboratorio

- Transporte inmediato
- A temperatura ambiente cortos periodos de tiempo, para no afectar la posterior recuperación de los microorganismos
- Los hemocultivos nunca deben ser refrigerados

5. Recepción y registro de los hemocultivos

- Deben ser examinados para comprobar:
- Que pueden ser manejados con seguridad
- Que estén íntegros, sin roturas o fisuras
- Que su identificación es correcta
- Que el volumen de sangre es adecuado
- Detectar macroscópicamente signos de crecimiento.
- No crecimiento

5. Recepción y registro de los hemocultivos

- Criterios de rechazo
  - Problemas de identificación serios
  - Frascos dañados o contaminados

- En el caso de graves deficiencias en el envío de la muestra se contacta con el servicio que la remite para solucionarlas y después se procesa.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Métodos manuales
- Convencional
  - Observación macroscópica de los signos de crecimiento de una pareja de frascos con medio de cultivo líquido, en los que se ha inoculado la sangre del paciente.
  - Caldo triptosa soja, Columbia, infusión cerebro corazón, *Brucella,* tioglicolato y caldo de peptona suplementado y en ocasiones medios con resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico previo.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Métodos manuales

- Bifásico
  - Un frasco con un medio compuesto de una fase sólida y otra líquida. Al inclinar el frasco, el medio líquido cubre totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo en el mismo cuantas veces se desee, sin necesidad de abrir la botella.

6. Procesamiento de los hemocultivos

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

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Métodos manuales
- Lisis-centrifugación. Sistema Isolator (DuPont).
  - Consiste en un tubo que contiene saponina como agente lisante, polipropilenglicol como agente antiespumante, SPS y EDTA como anticoagulantes y un líquido fluoroquímico inerte. Tras la inoculación de la sangre, se lisan las células. Se centrifuga el tubo a 3.000xg durante 30 minutos. Después se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en distintos medios de cultivo.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Métodos manuales
- Manométrico. Sistema Signal (Oxoid).
  - Consta de una botella con caldo de cultivo a la que, se le acopla una pequeña cámara con una aguja que llega hasta el fondo del medio líquido. La producción de gas durante el crecimiento bacteriano provoca un aumento de la presión desplazando el medio de cultivo líquido a través de la aguja introduciéndose en la cámara. La presencia de medio de cultivo en la cámara indica crecimiento bacteriano de manera rápida y sencilla

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Métodos automáticos**
- Radiométricos
  - Bactec 460 (Becton Dickinson)
    - Utiliza substratos marcados con ^{14}C que al ser metabolizado por los microorganismos libera $^{14}CO_2$ al medio, que difunde a la atmósfera del frasco. Se mide periódicamenrte el nivel de $^{14}CO_2$ y se expresa como un índice de crecimiento cuando se compara con los niveles de CO_2 en frascos de control.
      - Inconvenientes
        - Manejo y posterior eliminación de los residuos radiactivos.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Métodos automáticos**
- No radiométricos
- Los sistemas Bactec NR-660 y NR-730 detectan el CO_2 por espectrometría de infrarrojos.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Métodos automáticos**

- **Monitorización continua**
  - Ventajas
    - Eliminan toda manipulación
    - Agitación continua de los frascos
    - Monitorización continua, con notificación inmediata de los resultados positivos
    - Utilizan técnicas no invasoras para la lectura

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Métodos automáticos**
- **Monitorización continua**
- Se basan en la detección de la producción de CO_2 por los microorganismos
- Difieren en
  - el método de detección de CO_2
  - en la capacidad de los frascos
  - en el tipo de medio de cultivo utilizado
  - en la frecuencia de lectura
  - en la capacidad máxima de los incubadores

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
  - **Bactec-9240 (Becton Dickinson)**
    - El **CO_2** producido por el metabolismo bacteriano reacciona con un material **fluorescente** situado en el fondo del frasco del hemocultivo
    - Los **fotosensores** miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO_2 producida por el microorganismo
    - El sistema realiza una **lectura** de todos los frascos cada **10 minutos** y mediante un sistema luminoso de alarma indica los frascos positivos detectados en cada lectura.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
  - Bactec-9240 (Becton Dickinson)

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
  - **Sistema Vital (bioMerieux)**
  - Indicador fluorescente en el medio de cultivo
  - Como consecuencia del metabolismo microbiano se producen cambios en el pH, en el potencial redox o en el nivel de CO_2
  - Provoca una disminución de la fluorescencia del indicador
  - La fluorescencia se lee cada 15 minutos por medio de un detector diodo/fotón luminescente no invasor

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
- **ESP (Difco Laboratories)**
- Sistema automático no invasor
- Los frascos se colocan en cajones y los de anaerobios no se agitan
- Monitoriza los frascos cada 12 minutos
- El crecimiento se mide por un método manométrico que detecta el consumo y/o la producción de gas

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
- ESP (Difco Laboratories)

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Monitorización continua**
- **BacT/Alert (Organon Teknica)**
  - Primer sistema comercial no invasor de agitación y monitorización continua de cada frasco.
  - Detecta el CO_2 producido por el crecimiento microbiano utilizando un sensor colorimétrico interno pegado al fondo de los frascos.
  - A medida que cambia el color del sensor, la cantidad de luz reflejada se incrementa y es cuantificada como un aumento del voltaje.
  - Las señales se analizan en un ordenador por medio de un algoritmo.
  - La lectura se realiza cada 10 minutos.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Monitorización continua
- BacT/Alert (Organon Teknica)

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Hemocultivos **positivos**
- Aspirar asépticamente de 3 a 5 ml de caldo del frasco.
- Introducirlos en un tubo estéril.
- Depositar una gota en un portaobjetos para realizar la **tinción de Gram.**
- Si no se observan microorganismos de puede realizar una segunda tinción con naranja de acridina, ha demostrado su utilidad en bacteriemias por *Brucella y Campylobacter*.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Hemocultivos **positivos**
- **El material aspirado, independientemente del resultado de la tinción de Gram**

Agar Sangre
Agar Chocolate

35-37ºC

Brucella
Agar Chocolate

Aerobia 5% de CO_2 24 h

Anaerobia 48-72 h

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Identificación y antibiograma preliminares**

- Debemos intentar obtener resultados lo antes posible
  - Bacteriemias monomicrobianas los resultados preliminares coinciden en un 90% con los definitivos.
  - La identificación de bacterias grampositivas y su morfología tiene un alto valor predictivo.

6. Procesamiento de los hemocultivos

- **Informe preliminar**
- El resultado de la tinción de Gram
- El número de hemocultivos en los que se observan con referencia al total de los extraídos (ej: BGN ½)
- La fecha de obtención de los mismos.

- **Informar de que el informe preliminar será seguido de uno definitivo**

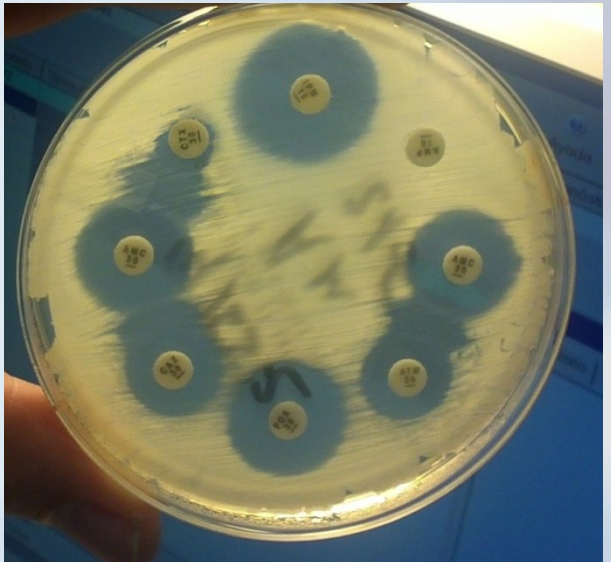
6. Procesamiento de los hemocultivos

- Identificación preliminar de microorganismos de hemocultivos basada en la tinción de Gram

	Tinción de Gram	Identificación preliminar
Cocos	Gram (+) en racimos	TSI, DNAsa o coagulasa, novobiocina, antibiograma en agar Mueller Hinton
	Gram (+) en diplos o cadenas	Optoquina, bacitracina, bilis-esculina, antibiograma en agar sangre
	Gram (-)	Antibiograma en agar chocolate incubado en CO_2 (*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

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Al mismo tiempo que se realiza la identificación a partir del caldo de cultivo también debe realizarse un antibiograma preliminar
  - Para disponer rápidamente de la sensibilidad del microorganismo.
  - La correlación de este procedimiento con los resultados del antibiograma definitivo realizados a partir de colonias aisladas oscila entre 87 y 99,3%.



6. Procesamiento de los hemocultivos

- Tras el crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo→se realizan pruebas de sensibilidad por los métodos estándar.

Identificación a nivel de especie y ATB
(galerías comerciales o paneles de sistemas semiautomatizados)

6. Procesamiento de los hemocultivos

- Informe definitivo

- Obtenida la información definitiva, se emitirá un informe escrito.

- Los microorganismos considerados como contaminantes se identificarán sólo al nivel de género.

- Se informará también **verbalmente** en el caso de que los resultados sean discrepantes con los proporcionados previamente.

Hemocultivo positivo
Bot Aer 1/2

GRAM → Informe Preliminar

Bacilo Gram negativo

MCK y ATB

24h

Pseudomonas con ATB → Informe Preliminar

Nota

AS y CH

24h

Posible Pseudomonas (ox pos)

Microscan

24h

P. aeruginosa con ATB → Informe definitivo

7. Interpretación de los resultados

- Un hemocultivo puede ser positivo sin que ello represente un episodio verdadera de bacteriemia
- La sangre puede contaminarse:
  - La propia microbiota cutánea del enfermo o del personal en la extracción
  - El laboratorio durante la manipulación de los hemocultivos puede inocular microorganismos de manera accidental
- Si la técnica de extracción, transporte y procesamiento es correcta, no debe contaminarse más de un 3% de todas las extracciones.

7. Interpretación de los resultados

- Distinción entre Bacteriemia verdadera y la que no lo es, constituye un asunto de la máxima importancia.
- Ayuda la propia identidad del microorganismo

estafilococos coagulasa negativa
Streptococcus del grupo viridans
Corynebacterium spp.
Propionibacterium acnes
Bacillus spp.
especies de Clostridium

Responsables de< 5% de las bacteriemias verdaderas

7. Interpretación de los resultados

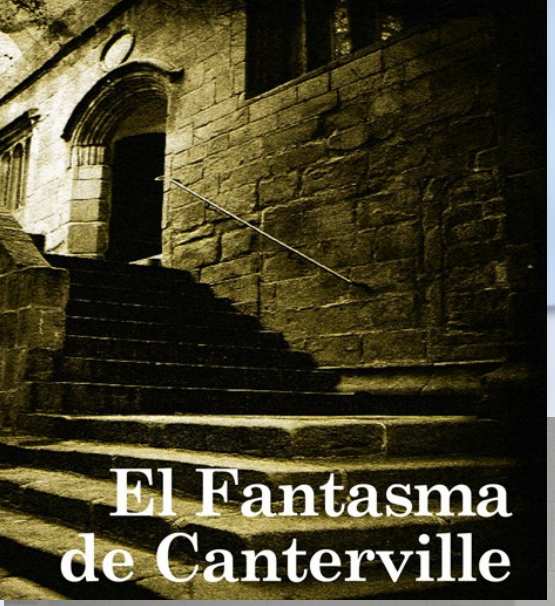
- Pero algunos de estos últimos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias
  - Su identidad no es suficiente para establecer el criterio de significación clínica.
  - Es preciso la identificación de la misma **bacteria en más de una extracción**.
  - De esta manera aumenta la probabilidad de que se trate de una bacteriemia verdadera.
  - Por tanto **un solo hemocultivo** positivo de estos microorganismos, de extracciones seriadas en un corto período de tiempo sugiere una **contaminación.**

7. Interpretación de los resultados

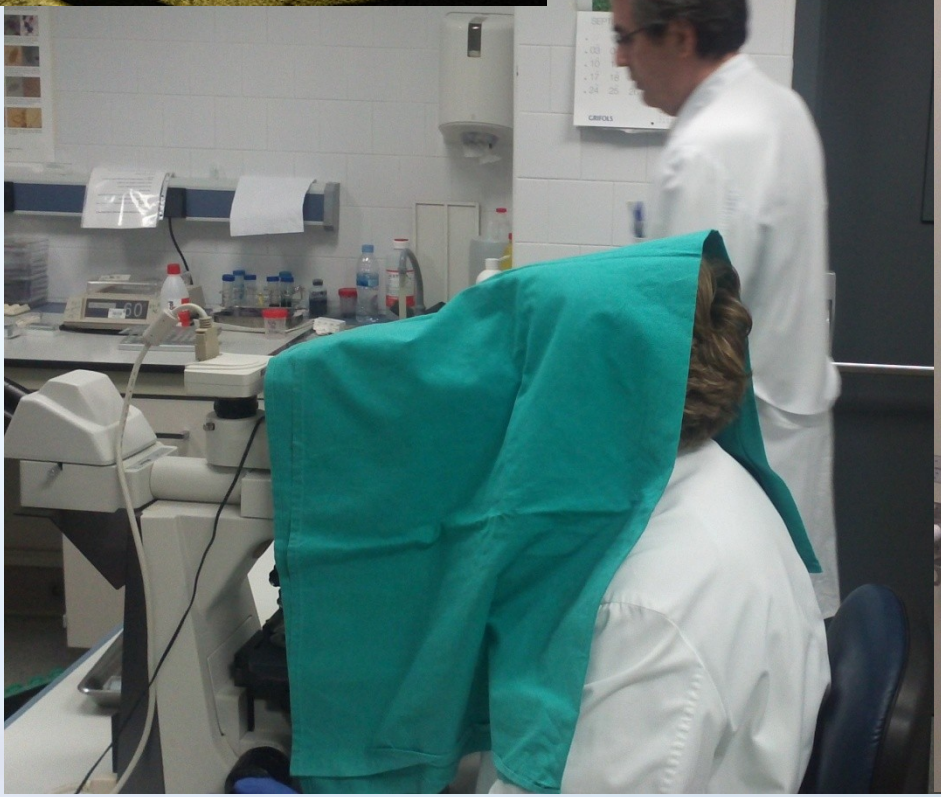
- El valor, de los hemocultivos cuantitativos y los obtenidos secuencialmente, para predecir la bacteriemia verdadera ha sido cuestionado.
  - Caso endocarditis→bacteriemia continua→ en teoría todos positivos
  - La mayoría de las bacteriemias son transitorias→ solo el 70-80% de los hemocultivos son positivos.
  - Es importante para la interpretación, la existencia de cuerpos extraños o focos infecciosos, de los que se haya aislado el mismo microorganismo que en la sangre.

7. Interpretación de los resultados

- En muchas ocasiones el laboratorio no dispone de elementos suficientes para establecer con seguridad la significación de la bacteriemia y la "falsa bacteriemia".
- El microbiólogo comparte la información que posee con el clínico responsable del paciente para, junto con los datos clínicos de éste, valorar conjuntamente los resultados obtenidos.


El Fantasma
de Canterville

ALFRED HITCHCOCK'S
PSICOSIS



Bacteriemia verdadera?
Gracias por vuestra atención