

ARTÍCULO
ORIGINAL

Federico Javier Ortiz - Ibarra,
José Eduardo Oliva-Marín,
Jesús Reyna- Figueroa,
Diana Mercedes Soriano
Becerril.

Instituto Nacional de Perinatología
Departamento de Infectología e
Inmunología Perinatal
Montes Urales 800, Colonia
Lomas Virreyes, Delegación
Miguel Hidalgo, CP 11000,
México DF.

Evaluación controlada del volumen de sangre necesario para la detección de bacteriemia o funguemia en recién nacidos

RESUMEN

Introducción. Los recién nacidos son sometidos a frecuentes extracciones sanguíneas con fines diagnósticos, además de la toma seriada de hemocultivos. Estas prácticas contribuyen al desarrollo de anemia y complicaciones posteriores. A pesar del uso uniforme de hemocultivos para el diagnóstico de sepsis, el volumen óptimo de sangre requerido para detectar bacteriemia o funguemia en neonatos aún no ha sido establecida.

Material y métodos. Mediante un ensayo in vitro, se seleccionaron patógenos neonatales comunes, como *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* y *Candida albicans*, para posteriormente hacer la inoculación en sangre estéril con diluciones de bacterias u hongos (10 ufc/ml. y 1 ufc/ml.). Para cada microorganismo, 4 botellas Pedi- Bact / Alert fueron inoculadas y se incubaron por 7 días en el sistema automatizado de detección.

Resultados. Se estudiaron un total de 24 muestras inoculadas, todas ellas positivas a desarrollo microbiano. El tiempo promedio de positividad de las botellas inoculadas independientemente de la cantidad de ufc/ml. fue de 16.5 ± 7.3 horas,

De los microorganismos estudiados *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron las que más rápido dieron positividad con 11.5 y 10.3 horas respectivamente, en promedio, mientras que *C. albicans* fue el microorganismo que tardó más tiempo en reportarse como positivo, 26.3 horas en promedio.

Palabras clave: hemocultivo, sepsis neonatal, recién nacido

ABSTRACT

Introduction: A lot volume of blood is extracted from the newborn for diagnostic purposes. Including blood samples for cultures with subsequent complications like anemia. However, the daily use of blood cultures to sepsis diagnosis, the volume values to detect bacteriemia or funguemia in newborns are not available.

Material and methods: In a in-vitro assay, we selected six more common pathogens of neonatal sepsis as *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* and *Candida albicans*, latterly we inoculated into sterile blood the microorganisms in two dilutions, the first with 10 UFC/ml. and the second one with 1 UFC/ml. To each microorganism we inoculated 4 bottles (Pedi-Bact / Alert) and subsequently were incubated for seven days into an automated detection system. Results: We inoculated 24 bottles, with positives results to microorganism's growth into a mean time of 16.5 ± 7.3 hours,

E. coli and *K. pneumoniae* were the faster microorganisms to growth with 11.5 and 10.3 hours in mean respectly. *C. albicans* was the microorganism slower to growth with 26.3 hours.

Key words: Culture blood, neonatal sepsis, newborn.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de sepsis en el recién nacido (RN), es una tarea difícil, ya que representa un diagnóstico diferencial ante la presencia de casi cualquier signo de alteración neonatal (apneas, bradicardia, problemas respiratorios, intolerancia a la alimentación o inestabilidad térmica). De todos los RN ingresados a unidades de cuidados intensivos, 3-5% presentan sepsis, corroborada por cultivo ⁽¹⁾.

Estos RN son sometidos a frecuentes extracciones sanguíneas con fines diagnósticos. En ocasiones, el volumen total de sangre extraído es tal, que el paciente desarrolla alteraciones hemodinámicas y anemia. La toma seriada de hemocultivo contribuye al desarrollo de tales complicaciones, por lo cual, a pesar de ser incorrecto, se prefiere tomar solo una. Por lo tanto, es importante buscar alternativas mediante las cuales se pueda disminuir el volumen de cada una de las muestras, de tal manera que se pueda obtener como mínimo dos hemocultivos en tiempos diferentes, sin afectar la homeostasis del niño. ⁽²⁾

A pesar del uso uniforme de hemocultivos para el diagnóstico de sepsis, el volumen óptimo de sangre requerido para detectar bacteremia o funguemia en neonatos aún no ha sido establecida. Se han realizado varias evaluaciones sistemáticas de la cantidad de sangre necesaria para la detección de microorganismos en el paciente pediátrico y neonatal⁽²⁻⁹⁾. Estas evaluaciones han despertado interrogantes acerca de la efectividad de volúmenes mínimos de sangre en la detección de bacteremia o funguemia en el neonato⁽¹⁰⁾. Sin embargo en el RN gravemente enfermo y de muy bajo peso al nacer, volúmenes de 1 ml. o más son difíciles de obtener. ⁽¹⁰⁾

Por lo anterior nos propusimos determinar mediante un estudio in vitro el volumen mínimo de sangre, así como el número mínimo de microorganismos requeridos para la detección óptima de bacteriemia o funguemia utilizando un sistema automatizado de cultivos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Mediante un ensayo in vitro, en el cual seleccionamos e inoculamos diferentes especies de microorganismos a sangre obtenida del banco de sangre del Instituto Nacional de Perinatología, en la que se corroboró esterilidad mediante cultivos previos

Selección y cuantificación de microorganismos.

Se seleccionaron patógenos neonatales comunes, como *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (aislamiento clínico), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 33495), *E. faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 10231), para posteriormente suspenderlos en caldo Mueller Hinton.

Los microorganismos se diluyeron a la 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (ml.), se midió la turbidez con un nefelómetro de MacFarland y posteriormente se efectuaron diluciones adicionales hasta obtener una dilución final de 10³ ufc/ml. La cuantificación de colonias en agar soya tripticasa enriquecida con sangre de carnero al 5%, verificó la dilución final.

Inoculación de los microorganismos en la sangre.

Se utilizó sangre de un solo donador, adicionada con anticoagulante. Un mililitro de la suspensión de cada agente etiológico se inoculó en 99 ml. de sangre para conseguir una cuenta baja de colonias de bacterias u hongos (10 ufc/ml.). De forma similar se inoculó 0.1 ml. de la suspensión de cada microorganismo en 99.9 ml. de sangre para obtener una cuenta baja de colonias de bacterias u hongos (1 ufc/ml.).

Inoculación de las botellas de cultivo.

Para cada microorganismo, 4 botellas Pedi- Bact / Alert fueron inoculadas.

- La primera con 0.2 ml. de la sangre con cuenta de 10 ufc/ml.

- La segunda con 0.5 ml. de sangre con la cuenta de 10 ufc/ml.
- La tercera con 0.2 ml. de la sangre con cuenta de microorganismos de 1 ufc/ml.
- La cuarta con 0.5 ml. de la sangre con cuenta de 1 ufc/ml.

En total 24 botellas de hemocultivos se incubaron en el sistema automatizado con microorganismos, dos botellas más sin microorganismos se inocularon para confirmar el estado estéril de la sangre.

Incubación de las muestras.

Todas las botellas se incubaron por 7 días en el sistema automatizado de detección. Se consideró el tiempo de positividad y se cultivaron en agar soya tripticasa enriquecida con sangre de carnero al 5%, e incubándose a 37°C. Al mostrar la placa crecimiento, se identificó al microorganismo mediante el sistema automatizado de bioquímica microbiológica Micro-Scan.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 24 muestras inoculadas, todas ellas positivas a desarrollo microbiano. El tiempo promedio de positividad de las botellas inoculadas, independientemente de la cantidad de ufc/ml. fue de 16.5 ± 7.3 horas, encontrándose las cifras en cuanto a tiempo de positividad en las botellas inoculadas con 10 ufc/ml. de 17.8 horas vs 15.3 horas de los inoculados con 1 ufc/ml.

De los microorganismos estudiados *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron las que más rápido dieron positividad con 11.5 y 10.3 horas respectivamente en promedio, mientras que *C. albicans* fue el microorganismo que tardó más tiempo en reportarse como positivas con 26.3 horas en promedio. El resto de los datos se presentan en la tabla 1.

Tomando en conjunto todos los microorganismos, el rango de diferencia entre ambos volúme-

nes, utilizando la dilución 10 ufc/ml., osciló entre 18 minutos y 2 horas. El rango de diferencia entre ambos volúmenes utilizando la dilución de 1 ufc/ml., osciló entre 0 minutos y 3 horas.

DISCUSIÓN.

La bacteriemia en lactantes y niños de mayor edad puede ser detectada a pesar de las muestras escasas de sangre que usualmente son cultivadas⁽⁷⁾. En el caso de los RN esto es de especial importancia, ya que su volumen corporal no permite extraer con facilidad la muestra sanguínea para ser cultivada, en busca de microorganismos.

El aislamiento de bacterias u hongos a partir de la sangre de RN gravemente enfermos, es de suma importancia tanto desde el punto de vista diagnóstico como pronóstico. RN con sospecha de sepsis, frecuentemente son tratados con antimicrobianos hasta que sus cultivos persisten negativos por espacio de 72 horas. He aquí la importancia de los sistemas automatizados de cultivo, con los cuales se puede detectar bacteriemia o funguemia utilizando volúmenes mínimos de sangre, en un periodo corto de tiempo.

En los adultos, el volumen de sangre para cultivo es el factor más importante que determina el aislamiento^(4, 7). Numerosos reportes indican que entre mayor sea el volumen de sangre, mayor la posibilidad de aislamiento⁽¹¹⁻¹⁶⁾. Mermel y Maki⁽¹⁶⁾ concluyeron que el aislamiento de bacterias en sangre aumenta en un 3% por cada ml. extra de sangre cultivada. Extrapolar datos de los reportes en adultos a los RN, resulta problemático. La extracción de grandes cantidades de sangre a los neonatos, no solamente es técnicamente difícil, sino que puede conllevar a la necesidad de transfusiones sanguíneas, lo que representa incremento en los riesgos⁽²⁾.

El volumen recomendado para un hemocultivo en pediatría oscila entre 0.5 a 1 ml. En la práctica clínica diaria, la cantidad de sangre inoculada

Tabla 1. Características de las diluciones y tiempos de positividad

Microorganismo	Dilución estimada (Ufc/ml.)	Colonias en Soya tripticasa	Volumen (ml.)	Tiempo de positividad (hrs)
<i>E. coli</i>	10	15	0.5	9.3
	10	15	0.2	9.8
	1	6	0.5	12.0
	1	6	0.2	13.4
<i>E. faecalis</i>	10	14	0.5	12.2
	10	14	0.2	13.2
	1	3	0.5	14.0
	1	3	0.2	14.0
<i>K. pneumoniae</i>	10	12	0.5	9.5
	10	12	0.2	9.8
	1	4	0.5	10.7
	1	4	0.2	11.2
<i>S. epidermidis</i>	10	13	0.5	23.5
	10	13	0.2	21.5
	1	1	0.5	24.7
	1	1	0.2	28.0
<i>S. aureus</i>	10	17	0.5	11.8
	10	17	0.2	12.5
	1	7	0.5	13.2
	1	7	0.2	14.8
<i>C. albicans</i>	10	5	0.5	24.3
	10	5	0.2	26.0
	1	1	0.5	28.0
	1	1	0.2	30.3

es frecuentemente menor a 0.5 ml. Un estudio prospectivo con 298 juegos de hemocultivos, tomados en neonatos críticamente enfermos, encontró que el 55% de dichas botellas contenía menos de 0.5 ml. de sangre ⁽¹¹⁾. A la vez que se han hecho múltiples estudios utilizando 0.02 ml. de sangre, obteniendo resultados satisfactorios ^(9, 10, 14-16). A pesar de estos estudios, no se ha establecido firmemente la utilidad de volúmenes mínimos de sangre en los hemocultivos de pacientes recién nacidos.

Existe el concepto que los niños pequeños, siempre presentan bacteremias con cuentas de

colonias elevadas ^(1, 11). Sin embargo, se han desarrollado diversos estudios ^(12, 17, 18) en los cuales se ha determinado que existen bacteremias con cuentas bajas de colonias en niños pequeños y neonatos. Dichas bacteremias no pasan desapercibidas al utilizar los sistemas automatizados de hemocultivos.

En el presente estudio se determinó que el sistema automatizado (en este caso Bact/alert) detectó a 6 microorganismos comúnmente encontrados en los neonatos, con volúmenes de sangre de 0.2 ml. y concentraciones mínimas de microorganismos (1-10 ufc/ml.).

BIBLIOGRAFÍA

1. Kurlat I. Time of positivity for detection of bacteremia in neonatos. *Clin microbiol* 1989; 27: 1068-1071.
2. Shelonka R. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 1996; 129: 275-8.
3. Issacman D. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *J Pediatr* 1996; 128: 190-5.
4. Yagupsky P. Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbial. Rev.* 1990; 3: 269-79.
5. Paisley JW. Pediatric blood cultures. *Clin Lab Med* 1994; 14: 17-30.
6. Jacobs RF. Septic shock in children, bacterial etiologies and temporal relationships. *Pediatr Infect Dis J* 1990; 9: 196-200
7. Washington JA. Blood cultures in the initial evaluation for neonatal sepsis during the first week of life. *Pediatr Infect Dis J* 1991; 10: 365-369.
8. Mangurten H. Diagnosis of neonatal bacteremia by microblood culture technique. *J Pediatr* 1977; 90: 990-2
9. Wiswell T. Multiple site blood cultures in the initial evaluation for neonatal sepsis during the first week of life. *Ped Infect Dis J* 1991; 10: 365-369
10. Knudson R. Neonatal Heelstick blood culture. *Pediatrics* 1980; 65: 505-7
11. Li J. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2829-31.
12. Plorde JJ. Specimen volume versus yield in BACTEC blood culture system. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 292-5.
13. Ilstrup DM. The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and funguemia. *Diag Microbiol Infect Dis* 1983; 1: 107-10.
14. Sandven P. The importance of blood volume cultured on the detection of bacteremia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1981; 89: 149-152.
15. Tenney JH. Controlled evaluation of volume of blood cultures in detection of bacteremia and funguemia. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 558-61
16. Mermel LA. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann Intern Med* 1993; 119: 270-2
17. Marshall GS. Correlates of high grade and low grade *Haemophilus influenzae* bacteremia. *Pediatr Infect Dis J*, 1988; 7: 86-90
18. Durbin WA. Quantitative blood cultures in childhood bacteremia. *J Pediatr* 1978; 92: 778-80