



PERINATOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN HUMANA

www.elsevier.es/rprh



ORIGINAL

El minihemocultivo como herramienta diagnóstica en sepsis neonatal

G. del Rey-Pineda^{a,b}, D. Villanueva-García^c y G. García-Elorriaga^{d,*}

^a Área de Investigación Biomédica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México

^b Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Ciudad de México, México

^c Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México

^d Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Ciudad de México, México

Recibido el 30 de abril de 2018; aceptado el 10 de junio de 2018

Disponible en Internet el 30 de julio de 2018

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico de sepsis;
Minihemocultivo;
Sepsis neonatal

Resumen

Objetivo: Diseñar un minihemocultivo usando de 200 a 300 μ l de sangre y comparar con el hemocultivo de referencia BACTEC peds plus/FTM BD.

Métodos: Se prepararon dos lotes de minihemocultivos HIM-1 y HIM-3 con diferente composición. Se les hizo el control de calidad que se lleva a cabo en el BACTEC, que es el hemocultivo automatizado de referencia. Se estudiaron 98 muestras de pacientes de la unidad de cuidados intensivos neonatales con probable sepsis y se estratificaron en dos grupos; en el primero, 48 muestras se inocularon en el HIM-1 y en el BACTEC pediátrico, y en el segundo, 50 muestras en el HIM-3 y en BACTEC pediátrico.

Resultados: HIM-1 y HIM-3 permitieron el crecimiento de los microorganismos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus* spp. hasta 10^2 UFC/ml (que es la concentración mínima de recuperación del hemocultivo de referencia). Los minihemocultivos no favorecieron el crecimiento de *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* de 10^2 UFC/ml. Para gramnegativos se obtuvo una sensibilidad del 80%, especificidad del 96%, valor predictivo positivo del 80% y valor predictivo negativo del 96%.

Conclusiones: HIM-1 y HIM-3, probablemente serían adecuados para el diagnóstico de sepsis neonatal temprana y en países en desarrollo, principalmente por gramnegativos, pero no para sepsis tardía, principalmente por estafilococos. En comparación con BACTEC, ahorran gran cantidad de muestra sanguínea.

© 2018 Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gelorriaga@webtelmex.net.mx (G. García-Elorriaga).

KEYWORDS

Diagnosis of sepsis;
Blood micro-culture;
Neonatal sepsis

Blood micro-culture as a diagnostic tool in neonatal sepsis**Abstract**

Objective: To design a blood micro-culture using 200 to 300 µl of blood and compare it with the reference BACTEC peds plus/FTM BD[®] blood culture.

Methods: Two batches of HEM-1 and HIM-3 blood micro-cultures, with different composition were prepared. They were quality controlled in the same way as that carried out in the BACTEC, which is the automated reference blood culture. A total of 98 samples taken from Neonatal Intensive Care Unit (NICU) patients with probable sepsis were studied and stratified into two groups. The first 48 samples that were inoculated into HIM-1 and BACTEC paediatric plates, and the second 50 samples in HIM-3 and in paediatric BACTEC plates.

Results: The microorganisms grown in HIM-1 and HIM-3 included: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *Enterococcus* spp up to 10² CFU/ml (which is the minimum recovery concentration of the reference blood culture). Micro-blood cultures did not improve the growth of *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. pneumoniae* of 10² CFU/ml. For Gram negatives, a sensitivity of 80%, specificity of 96%, positive predictive value (PPV) of 80%, and negative predictive value (NPV) of 96%, were obtained.

Conclusions: HIM-1 and HIM-3 are adequate for the diagnosis of early neonatal sepsis in developing countries, mainly by Gram negative, but not for late sepsis, mainly by staphylococci. Compared to BACTEC they save a lot of blood sample.

© 2018 Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La sepsis neonatal es un problema importante de salud pública mundial. Es una de las principales causas directas de mortalidad neonatal y es responsable de aproximadamente el 36% de los cuatro millones de muertes neonatales que ocurren anualmente, lo que da lugar a 670,000 muertes en Asia, África subsahariana y América Latina¹. En México y otros países en vías de desarrollo se informan tasas de 15 a 30 por cada 1,000 recién nacidos (RN), con una letalidad entre el 25 y el 30%². En el Instituto Mexicano del Seguro Social, entre 2004 y 2005 se encontró un incidencia de sepsis de 3.4/1,000 RN vivos en 3,633 nacimientos³. En México, la sepsis bacteriana del RN es la segunda causa de muerte (12.3%), en pacientes de uno a seis días de vida⁴.

A pesar del uso de hemocultivos para el diagnóstico de sepsis, el volumen óptimo de sangre necesario para detectar bacteriemia en RN no se ha establecido. No hay una evaluación sistemática de la cantidad de sangre⁵. El 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. 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 1 a 2 ml para recién nacidos. Los hemocultivos aún se consideran el «estándar de oro»

para la detección de microorganismos patógenos relacionados con bacteriemia y sepsis, a pesar de las nuevas técnicas moleculares. Este método permite la identificación y las pruebas de sensibilidad, que son un componente crítico para el manejo de sepsis; sin embargo, la falta de resultados rápidos y baja sensibilidad ha llevado al desarrollo de sistemas y pruebas moleculares o proteómicas complementarias⁶.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue diseñar un minihemocultivo usando de 200 a 300 µl de sangre y comparar con el hemocultivo de referencia BACTEC peds plus/FTM BD.

Métodos**Muestras de pacientes**

Se estudiaron 98 muestras de RN hospitalizados con diagnóstico probable de sepsis, en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) del Hospital Infantil de México «Federico Gómez», y se estratificaron en dos grupos; en el primero se inocularon 48 muestras en el HIM-1 y en el BACTEC pediátrico, y en el segundo se inocularon 50 muestras en el HIM-3 y en BACTEC pediátrico. Inocular los viales con 200 µl de sangre, colocar una aguja hipodérmica estéril para aerear e incubar a 35°, después de 24h hacer frotis y sembrar a ciegas en gelosa sangre, hacer esto cada 24h, y cuando sean positivos el frotis y la placa, hacer pruebas bioquímicas de identificación y emplear la tarjeta VITEK Biomerieux[®] para identificación del microorganismo. En forma paralela a la inoculación del vial, inocular el BACTEC[™] pediátrico siguiendo las indicaciones del fabricante. El estudio se aprobó por el Comité local de Bioética e Investigación del

hospital y los padres o tutores firmaron la carta de consentimiento informado.

Criterios de inclusión

- RN con diagnóstico probable de sepsis.
- Toma adecuada del hemocultivo en condiciones de asepsia y previamente al tratamiento antimicrobiano.
- Una muestra por paciente para BACTEC™ y de 2-7 para minihemocultivo (cada vez que se solicitaban muestras de sangre de los RN).

Preparación de minihemocultivos

Se preparó un lote de minihemocultivo HIM-1 cuya composición fue: caldo BHI, tioglicolato al 0.1%, citrato de sodio al 2% y polienriquecimiento para gelosa chocolate. También se preparó otro lote de minihemocultivo HIM-3 con la misma composición que HIM-1, pero se le agregó polianetol sulfonato de sodio (SPS) al 0.025% como anticoagulante: inhibe la actividad bactericida del suero contra muchas bacterias y parcialmente la fagocitosis, además inactiva el complemento⁷, neutraliza lisozimas y algunos antibióticos aminoglucósidos⁸ y polipeptídicos. Esterilizar a 121 °/15 min Posteriormente adicionar 1.8 ml de los respectivos medios a viales de vidrio estériles de 2.5 ml, tapar con tapón de hule estériles y engargolar. Se les hizo el control de calidad que se lleva a cabo en el BACTEC, que es el hemocultivo automatizado de referencia.

Control de calidad sugerido para el sistema automatizado y sensibilidad

Es necesario tener las cepas en su fase logarítmica, para lo cual se siembran en gelosa sangre cada 24 h. Las cepas usadas para BACTEC 9120 Becton Dickinson fueron: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y *Haemophilus influenzae* ATCC 10211. De la última siembra se prepara una suspensión al 0.5 de Mac Farland en el VITEK colorimeter Biomerieux® para obtener una concentración de 1×10^8 UFC/ml, después hacer diluciones seriadas 1:100 hasta obtener 1×10^2 UFC/ml. De la concentración 1×10^4 UFC/ml inocular 10 µl en gelosa sangre por duplicado para hacer una cuenta viable de aproximadamente 100 a 200 colonias y confirmar que las diluciones y la viabilidad fueron las adecuadas. Incubar en condiciones propias para cada microorganismo. Posteriormente de la concentración

de 1×10^2 UFC/ml, inocular 1 ml a cada botella del BACTEC e incubar. A las 24 h sembrar 100 µl en gelosa sangre por duplicado para hacer una cuenta viable. Incubar por 24 h y contar el número de colonias de cada cepa bacteriana, que corresponde a las UFC/ml mínimas que detecta el BACTEC™.

Después se procede a la identificación de los microorganismos. De esta manera se comprueban la viabilidad y la permisividad del crecimiento.

Control de calidad del minihemocultivo y sensibilidad

Se realizó exactamente lo mismo que se sugiere para el sistema automatizado. Únicamente se adicionaron algunas cepas más: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25422, *Enterococcus* spp. y *Staphylococcus epidermidis* silvestres. Además, de la concentración de 1×10^2 UFC/ml, inocular 200 µl a los viales de minihemocultivo e incubar.

Estadística

Se utilizó la chi cuadrado con la aplicación de la fórmula de corrección de Yates.

Resultados

Muestras de pacientes

En el primer grupo de las 48 muestras de RN con probable sepsis que se sembraron en BACTEC y en HIM-1, una muestra dio positiva en ambos hemocultivos para *E. coli*; 11 muestras positivas para *Staphylococcus epidermidis* y 3 para *Staphylococcus haemolyticus* con sus correspondientes HIM-1 negativos (tabla 1). En el segundo grupo, de las 50 muestras de RN que se sembraron en BACTEC y en HIM-3, una muestra dio positiva en ambos para *Streptococcus* spp.; 2 positivas para *Enterobacter cloacae* y una positiva para *Klebsiella pneumoniae* en ambos. Nueve muestras positivas para *Staphylococcus epidermidis* con sus correspondientes HIM-3 negativos (tabla 1).

Control de calidad para el sistema automatizado y sensibilidad

Todos los microorganismos probados desarrollaron satisfactoriamente, excepto *Clostridium perfringens* a una concentración de 1×10^2 UFC/mL, con una cuenta viable de

Tabla 1 Comparación de aislamientos de pacientes en BACTEC y minihemocultivos HIM-1 y HIM-3

BACTEC	HIM-1	N.º de muestras	Microorganismo	BACTEC	HIM-3	N.º de muestras	Microorganismo
Pos	Pos	1	<i>Escherichia coli</i>	Pos	Pos	2	<i>Enterobacter cloacae</i>
Pos	Neg	11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Pos	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Pos	Neg	3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Pos	Neg	9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
				Pos	Pos	1	<i>Streptococcus</i> spp

Neg: negativo; Pos: positivo.

Tabla 2 Comparación de la sensibilidad de minihemocultivos HIM-1 y HIM-3

Cepas	HIM-1	HIM-3
<i>Escherichia coli</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	Sin desarrollo	1×10^2 UFC/ml
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Enterococcus</i> spp.	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^2 UFC/ml	1×10^2 UFC/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1×10^2 UFC/ml	Sin desarrollo

aproximadamente 100 a 200 colonias, que corresponde a las UFC/ml mínimas que detecta el BACTEC™.

Control de calidad del minihemocultivo y sensibilidad

Todos los microorganismos probados se desarrollaron satisfactoriamente, excepto *Haemophilus influenzae* en HIM-1 y *Clostridium perfringens* en HIM-3 a una concentración de 1×10^2 UFC/ml, con una cuenta viable de aproximadamente 100 a 200 colonias, que corresponde a las UFC/ml mínimas que detectan los minihemocultivos (tabla 2). La especificidad a los microorganismos que detecta fue del 98% y la sensibilidad, del 100%.

Sensibilidad, especificidad y valores predictivos

Con los aislamientos obtenidos se contrastaron los de BACTEC™ utilizados como referencia contra los obtenidos con los minihemocultivos HIM-1 y HIM-3, obteniéndose para bacterias gramnegativas los siguientes resultados: sensibilidad 80%, especificidad 96%, valor predictivo positivo (VPP) 80% y valor predictivo negativo (VPN) 96%.

Discusión

En muestras de pacientes los minihemocultivos HIM-1 y HIM-3 tienen una utilidad comparable con el BACTEC™ cuando los agentes causantes de sepsis son bacilos gramnegativos y HIM-3 también para estreptococos.

La sepsis temprana se produce por colonización del feto, antes (vía ascendente) o durante el parto, por microorganismos procedentes del tracto genital materno. Esta colonización genital materna está también relacionada con la rotura prematura de membranas amnióticas, corioamnionitis y parto prematuro. La etiología es fundamentalmente bacteriana; en países desarrollados la causa más frecuente es *S. agalactiae*⁹, mientras que en países en vías de desarrollo son enterobacterias¹⁰⁻¹⁴. En relación con el peso al nacimiento, las enterobacterias son más frecuentes en niños con bajo peso al nacer¹⁵.

La sepsis tardía es una infección adquirida en el hospital y es complicación frecuente de la prematuridad extrema.

Se ha reportado estafilococo coagulasa negativa como el microorganismo etiológico principal¹⁶⁻¹⁸, pero el papel de los microorganismos gramnegativos está incrementando y la resistencia a los medicamentos está aumentando constantemente.

Otros autores¹⁹ han demostrado la utilidad del minihemocultivo simplemente utilizando el mismo medio de cultivo comercial, pero en menor volumen, con una muestra de 200 µl, guardando la misma relación volumen/muestra, obteniendo una sensibilidad y una especificidad tanto para gramnegativos como para grampositivos bastante aceptables, comparadas con las que obtuvimos en este estudio para gramnegativos.

En HIM-1 no desarrolló *Haemophilus influenzae* *in vitro* a la concentración mínima que debería crecer, pero sí lo hizo *Clostridium perfringens*, lo que le da ventaja sobre HIM-3 y aun sobre BACTEC™. Con respecto a los estafilococos coagulasa negativa, en ambos minihemocultivos desarrollaron *in vitro* pero no *in vivo*.

En cuanto a las diferencias de desarrollo de los microorganismos en los minihemocultivos *in vivo* e *in vitro*, proponemos que *in vivo* es probable que esté afectando la actividad bactericida del suero, la fagocitosis, el complemento, las lisozimas y algunos antibióticos aminoglucósidos y polipeptídicos que se administraran a la madre en forma previa.

Los minihemocultivos presentan ventajas significativas en comparación con el sistema automatizado BACTEC™ pediátrico; la cantidad de muestra requerida se reduce de 1 a 2 ml a 200 a 300 µl de sangre y además resultan económicos, ya que se fabrican en el laboratorio sin equipo sofisticado, requiriendo únicamente una campana de flujo laminar. Sin embargo, se tendría que pasar por un estricto control de calidad y someter a mayor escrutinio antes de plantearlo como una verdadera herramienta diagnóstica.

Conclusiones

Los minihemocultivos podrían ser de gran utilidad en el diagnóstico de sepsis neonatal en especial temprana y en países en desarrollo, en donde los agentes etiológicos principales son las enterobacterias, destacando lo económico que es producir el medio de cultivo ya descrito.

Financiamiento

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Hammoud MS, al-Taiar A, al-Abdi SY, Bozaid H, Khan A, al-Muhairi LM, et al. Late-onset neonatal sepsis in Arab states in the Gulf region: Two-year prospective study. *Int J Infect Dis.* 2017;55:125–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.006>.
2. Guías clínicas del departamento de Neonatología 2011. Hospital Infantil de México «Federico Gómez».
3. Prevención, diagnóstico y tratamiento de sepsis y choque séptico del recién nacido en el segundo y tercer nivel de atención. México: Secretaría de Salud; 2012.
4. Pérez RO, Lona JC, Quiles M, Verdugo MA, Ascencio EP, Benítez EA. Early neonatal sepsis, incidence and associated risk factors in a public hospital in western Mexico. *Rev Chilena Infectol.* 2015;32:387–92.
5. Neal PR, Kleiman MB, Reynolds JK, Allen SD, Lemons JA, Yu PL. Volume of blood submitted for culture from neonates. *J Clin Microbiol.* 1986;24:353–6.
6. Dreyer A.W. Blood culture systems: From patient to result, Azevedo L. Sepsis — An Ongoing and Significant Challenge. 287–310. 10.5772/50139.
7. Palarasah Y, Skjoedt MO, Vitved L, Andersen TE, Skjoedt K, Koch C. Sodium polyanethole sulfonate as an inhibitor of activation of complement function in blood culture systems. *J Clin Microbiol.* 2010;48:908–14.
8. Krogstad DJ, Murray PR, Granich GG, Niles AC, Ladenson JH, Davis JE. Sodium polyanethol sulfonate inactivation of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;20:272–4.
9. Puopolo KM. Epidemiology of neonatal early-onset sepsis. *Neo-reviews.* 2008;9:e571–9.
10. López-Sastre J, Fernández-Colomer B. Sepsis en el recién nacido. *An Pediatr Contin.* 2005;3:18–27.
11. Coronell W, Pérez C, Guerrero C, Bustamante H. Sepsis neonatal. *Rev Enfer Infect Pediatr.* 2009;23:57–68.
12. Viswanathan R, Singh AK, Mukherjee S, Mukherjee R, Das P, Basu S. Aetiology and antimicrobial resistance of neonatal sepsis at a tertiary care centre in eastern India: A 3 year study. *Indian J Pediatr.* 2011;78:409–12.
13. Zakariya BP, Bhat V, Harish BN, Babu TA, Joseph NM. Neonatal sepsis in a tertiary care hospital in South India: Bacteriological profile and antibiotic sensitivity pattern. *Indian J Pediatr.* 2011;78:413–7.
14. Shrestha S, Shrestha N, Dongol Singh S, Shrestha NC, Shrestha RP, Madhup SK. Bacterial isolates and its antibiotic susceptibility pattern in NICU. *Kathmandu Univ Med J.* 2013;41:66–70.
15. Fernández-Colomer B, López-Sastre J, Coto-Cotallo GD, Ramos-Aparicio A, Ibáñez-Fernández A. Sepsis del recién nacido. Asociación Española de Pediatría. Protocolos actualizados al año 2008. Consulte posibles nuevas actualizaciones en www.aeped.es/protocolos/
16. Vergnano S, Menson E, Kennea N, Embleton N, Russell AB, Watts T, et al. Neonatal infections in England: The NeonIN surveillance network. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2011;96:F9–14.
17. Hammoud MS, al-Taiar A, Thalib L, al-Sweih N, Pathan S, Isaacs D. Incidence, aetiology and resistance of late-onset neonatal sepsis: A five-year prospective study. *J Paediatr Child Health.* 2012;48:604–9.
18. Al-Taiar A, Hammoud MS, Cuiqing L, Lee JK, Lui KM, Nakwan N, et al. Neonatal infections in China, Malaysia, Hong Kong and Thailand. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98:F249–55, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2012-301767>.
19. Solorzano-Santos F, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, Diaz-Ponce H, Palacios-Saucedo G. A blood micro-culture system for the diagnosis of bacteremia in pediatric patients. *Scand J Infect Dis.* 1998;30:481–3.