



REAL ACADEMIA DE DOCTORS

---

Contribución al estudio  
de las Bacteriemias



Discurs d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

Il.lm. Sr. Miquel Marí i Tur

Doctor en Farmàcia

A l'acte de la seva recepció, 18 de juny de 1993, i

discurs de contestació de l'Acadèmic de Número

Excm. Sr. Manuel Subirana i Cantarell

Doctor en Medicina i Cirurgia

Barcelona

1993



Dr. Miquel Marí i Tur

Contribución al estudio  
de las Bacteriemias

REAL ACADEMIA DE DOCTORS

—Publicacions—



REAL ACADEMIA DE DOCTORS

---

# Contribución al estudio de las Bacteriemias



Discurs d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

**Il.lm. Sr. Miquel Marí i Tur**

Doctor en Farmàcia

A l'acte de la seva recepció, 18 de juny de 1993, i

discurs de contestació de l'Acadèmic de Número

**Excm. Sr. Manuel Subirana i Cantarell**

Doctor en Medicina i Cirurgia

Barcelona

1993

© Reial Acadèmia de Doctors  
Disseny: Anna Bosch i Baltasar  
Impressió: Impremta Baltasar 1861  
Tiratge: 1000 exemplars.

Dipòsit legal: B.19.961-93

*Hble Sr. President des Consell Insular d'Eivissa i Formentera,  
Excm. Sr. Alcalde de s'Ajuntament d'Eivissa,  
Excm. Sr. Degà President,  
Excms. Srs. Acadèmics,  
Senyores i Senyors:*

*Agraeix profundament sa benèvolencia que heu demostrat cap a sa meua persona, per haver-me concedit s'honor d'acceptar-me entre valtros com a Membre Corresponent de tan prestigiosa Corporació.*

*En sa inauguració des present curs, que va tenir lloc a s'historic marc des Palau de la Música de Barcelona, presidit per Ses Majestats els Reis D. Joan Carles i Da. Sofia i amb s'assistència de tan Il·lustres Membres components d'aquesta Reial Acadèmia, en escoltar sa meua nominació, vaig poder corroborar sa idea que sempre he tengut que quan major és sa vàlua de ses persones, menors són ses seues exigències cap a's altres, i de no ser així, sense dubte, no tendria sa satisfacció de compartir aquest acte amb valtros.*

*En aquestos moments de tanta emoció, no puc evitar recordar ses persones que d'alguna manera han influït en sa meua formació, tant humana com científica.*

*Permeteu-me un reconeixement en es suport que he rebut en tot moment des meus pares, en qualsevol de ses labors professionals que he realitzat durant sa meua vida.*

*També arriba a sa meua memòria sa inestimable ajuda que he*

*rebut des professors a qui dec sa meua formació, en especial s'eminent professor Dr. D. Jesús Guinea Sánchez, Catedràtic de Microbiologia de sa Facultat de Farmàcia de sa Universitat de Barcelona, que va tenir sa gentilesa de dirigir sa meua Tesi Doctoral i que amb es seu exemple i preparació científica ha estimulat sa meua afecció a ses feines d'estudi i investigació en aquest camp de ses ciències.*

*M'heu fet s'honor de desplaçar-vos a sa meua estimada illa, de la qual ha dit un des nostres escriptors que és d'immutable i variada policromia i habitada per un poble hospitalari, respectuós i amable; illa que ha sabut mantenir un equilibri perfecte entre tot allò que és modernitat i cosmopolitisme, i sa nostra història i costums tradicionals tan estimats pe's nostro poble.*

*Voldria que durant sa vostra estada a Eivissa, poguéssiu constatar aquesta descripció, tal volta un poc apassionada, pròpia d'una persona que estima sa seua terra.*

*A continuació, vos mostraré una modesta aportació d'un model d'experimentació realitzat en conills, que pretén facilitar s'estudi i millorament des mètodes de detecció des agents causals de ses septicèmies que, com és sabut, són causa d'un gran nombre de morts anuals.*

*Siguin ses meues darreres paraules per agrair-vos a tots sa vostra assistència a aquest acte. Moltes gràcies.*



## **PRIMERA PARTE**



## HISTORIA

Es un hecho conocido, que la coexistencia entre microorganismos y seres superiores, es en muchos casos necesaria para el desarrollo normal de sus procesos vitales.

Sin embargo, en determinadas circunstancias y en función del microorganismo que se instala en el huésped, pueden producirse episodios patológicos, capaces de poner en peligro la vida del organismo infectado.

La septicemia es un buen ejemplo de una relación desfavorable entre microorganismo y organismo colonizado.

El vocablo septicemia ya fue propuesto por Piorry<sup>70</sup> a finales del siglo pasado (1874) y desde entonces su significado ha ido evolucionando, no existiendo aun, un concepto uniforme acerca de la identidad del término, amén de la diferencia que presenta entre las escuelas de origen alemán "sepsis" y las de influencia francesa "septicemia".

Es importante destacar la diferenciación aportada por Liebermeister<sup>56</sup> (1875), entre los términos "enfermedad séptica" y "sepsis". Este autor, describía la *enfermedad séptica* como un "estado previo, generalmente local, con capacidad para generar sepsis, sin que ésta se produjera necesariamente en todos los casos". Por el contrario, consideraba que el término *sepsis* expresaba la existencia de un "fenómeno de diseminación bacteriana, con formación de metástasis y manifestaciones objetivas y subjetivas de enfermedad generalizada". De la misma manera, este autor distinguía entre "foco séptico" y "foco de sepsis". Al primero, lo

definió como *“un anidamiento bacteriano en los tejidos que provoca reacciones necróticas centrales, con reacción periférica inflamatoria deslindante o sin ella”*, mientras que en el segundo, *“se establece una relación íntima entre el foco de sepsis y un segmento del sistema circulatorio”*, siendo esta comunicación el hecho esencial que provoca la transformación de un estado a otro.

Según Pedro Pons y colaboradores<sup>68</sup> (1967), en el concepto de sepsis existen dos hechos fundamentales, por una parte, el paso de bacterias a la sangre y por otra, la presencia de un *foco séptico* suministrador de las mismas. Este último concepto se debe a Schottmüller<sup>79</sup> (1914), quien consideraba la sepsis como *“la infección por diferentes bacterias que actúan en un organismo sensibilizado, con paso de ellas desde focos necróticos infectados a la sangre a través del sistema circulatorio, originándose en consecuencia metástasis y manifestaciones clínicas generales”*. Es decir que no existía proliferación bacteriana en la sangre, sino que ésta se limitaba a recibir los microorganismos del *foco de sepsis* y diseminarlos por todo el organismo.

Otro término que es importante precisar es aquel que viene definido por el vocablo *“bacteriemia”*. Strand y Shulman<sup>82</sup> (1988), lo definen como *“el transporte de bacterias por la sangre como sustancias inertes, sin provocar en ningún caso los síntomas generales característicos de la sepsis ni focos metastásicos”*, como ocurre por ejemplo tras la remoción de focos sépticos dentarios, en el curso de intervenciones quirúrgicas o exploraciones urológicas entre otros casos, mientras que para ellos, el término *septicemia* implica *“la existencia prácticamente constante en toda la evolución de una cantidad mayor o menor de bacterias patógenas en la sangre, asociadas a signos clínicos de infección”*, tales como fiebre, escalofríos, taquicardia, hipotensión, shock y leucocitosis entre otros (Washington<sup>94</sup>, 1978).

## ORIGEN DE LAS BACTERIEMIAS

En general, la puerta de entrada de los microorganismos de procedencia extravascular al torrente sanguíneo, es el sistema linfático. La posibilidad de que se produzca una bacteriemia depende, además de la capacidad defensiva del sistema inmunitario del individuo, de la existencia de ciertas condiciones locales como pueden ser la manipulación de la zona afectada, la cantidad y disposición anatómica de los vasos linfáticos de la zona, y el aumento de la presión localizada, que puedan favorecer el drenaje de la linfa desde la zona infectada hacia el conducto torácico y los vasos de retorno transportadores de la sangre venosa.

Sin embargo, también puede tener lugar la entrada directa de microorganismos a la corriente sanguínea, como ocurre en las infecciones intravasculares tales como la endocarditis infecciosa, fístulas arteriovenosas infectadas, aneurismas micóticos, flebitis supurativas y como consecuencia de la aplicación de catéteres intravenosos y arteriales (Reller et al.<sup>73</sup>,1982).

Hay que tener en cuenta que en la relación parásito-huesped, interviene de un modo fundamental el poder bactericida de la sangre, que normalmente no permite la multiplicación de los microorganismos invasores, quedando en ocasiones, circunscritos a pequeños focos sépticos o ulteriores focos metastásicos, que mantienen una situación latente de contaminación hemática. La puerta de entrada o foco origen del proceso no siempre resulta fácil de localizar y en ciertas ocasiones puede pasar desapercibido, dando lugar a las denominadas *sepsis criptogénicas*.

Cuando las bacterias alcanzan el torrente circulatorio,

generalmente son destruidas por macrófagos que forman parte de la estructura de órganos tales como el hígado y el bazo, así como por los fagocitos circulantes presentes en la sangre, con la colaboración del sistema del complemento, las inmunoglobulinas y demás mecanismos inmunológicos del individuo colonizado (Reller et al.<sup>73</sup>,1982).

Sin embargo, ciertos microorganismos como *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Brucella* y *Listeria* entre otros, presentan la capacidad de sobrevivir en el interior de la célula después de ser fagocitados. Son los denominados parásitos intracelulares (Riley y Robertson<sup>74</sup>,1984).

Como señalan Reller et al.<sup>73</sup>(1982), los orígenes más comunes de las bacteriemias son en un 25% el tracto genito-urinario, en un 20% el árbol respiratorio, en un 10% abscesos diversos, un 5% se originan a partir de heridas quirúrgicas, otro 5% tiene su origen en el tracto biliar, un 10% corresponde a localizaciones diversas y el foco original del 25% restante es desconocido.

## TIPOS DE BACTERIEMIAS

Desde un punto de vista clínico, las bacteriemias pueden clasificarse en transitorias, intermitentes y continuas (Washington e Ilstrup<sup>97</sup>, 1986).

Las bacteriemias transitorias, aparecen como consecuencia de una manipulación de:

- a) tejidos infectados (abscesos, forúnculos, celulitis).
- b) superficies mucosas contaminadas (manipulaciones dentales o urológicas, endoscopias, cateterización uretral y sigmoidoscopia).
- c) áreas contaminadas en el curso de intervenciones quirúrgicas (histerectomía vaginal, resección transuretral de la próstata, quemaduras infectadas) .

En la mayoría de los casos, la llegada súbita de bacterias a la sangre es asintomática, o como máximo produce escalofríos y fiebre transitoria, que se autolimita mediante los mecanismos inmunológicos del individuo (Strand y Shulman<sup>82</sup>, 1988).

Fisiológicamente también pueden observarse bacteriemias transitorias como consecuencia de una vasodilatación de ciertas mucosas en contacto con bacterias, como ocurre en el caso de las bacteriemias post-prandiales.

En el caso de las bacteriemias intermitentes, los focos sépticos pueden estabilizarse y producir consecuentemente, una siembra continua de microorganismos al torrente circulatorio. Estas se asocian a menudo con diversos tipos de abscesos no drenados: intra-abdominales, pélvicos, perinefríticos, hepáticos y

prostáticos (Washington e Ilstrup<sup>97</sup>, 1986).

Por último, las bacteriemias continuas, son características de la endocarditis aguda y subaguda, de infecciones intravasculares, así como de las primeras semanas de fiebre tifoidea, brucelosis y leptospirosis (Washington e Ilstrup<sup>97</sup>, 1986, y Finegold y Baron<sup>28</sup>, 1989).



## VARIACION DEL AGENTE CAUSAL

A lo largo de los años se ha observado una variación en la incidencia de los diferentes microorganismos causales de las septicemias.

Ya Waisbren<sup>89</sup> en su trabajo publicado en 1957, señaló que en USA, los bacilos Gram negativos con la excepción de *Salmonella*, eran los agentes etiológicos responsables de las bacteriemias más frecuentes. También McCabe y Jackson<sup>61</sup> en 1962, describieron en su trabajo de revisión de hemocultivos realizados entre 1951 y 1958, un notable aumento de bacteriemias por microorganismos Gram negativos, en comparación con los datos históricos de aislamiento bacteriano del periodo preantibiótico.

Según Kreger et al.<sup>53</sup> (1980), el incremento observado de bacteriemias por gram negativos, puede deberse a una aplicación indiscriminada de la terapéutica antimicrobiana, así como a los nuevos procedimientos utilizados en la medicina hospitalaria.

Por otra parte, Holm<sup>40</sup> (1982) señala que la disminución de las infecciones producidas por neumococos, se han visto superadas por las debidas a Gram negativos y *Staphylococcus*. Según él, una de las posibles explicaciones podría ser la implantación de la antibioticoterapia, que ha significado el descenso de la frecuencia de la sepsis puerperal, fiebre reumática o neumonía neumocócica y por lo tanto, una disminución de *Streptococcus viridians*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* como agentes causales de dichos procesos. Del mismo modo, Brooks y Cobbs<sup>11</sup> (1983) estiman que en USA anualmente se producen 140.000 casos de bacteriemias por Gram negativos.

También hay que tener presente la aparición de un nuevo grupo de enfermos que desarrollan sepsis y que anteriormente no existían, debido a las diferentes condiciones de actuación sanitaria. Son enfermos que adquieren estas infecciones durante su estancia en el centro hospitalario o bien que desarrollan la septicemia de forma espontánea al poco tiempo de su ingreso. Entre estos últimos figuran aquellos que se hospitalizan con infecciones localizadas tales como neumonía, pielonefritis, faringoamigdalitis o extracciones dentarias entre otras, es decir, pacientes en los que no exista a priori ningún problema inmunitario basal. En cambio, los pacientes enmarcados en el primer grupo son los denominados "comprometidos" cuyos agentes causales pertenecen al grupo de baja virulencia, que incluyen los denominados agentes oportunistas.

Este hecho también lo ha descrito Kiehn<sup>46</sup> (1989) al hallar un incremento de microorganismos Gram positivos, incluyendo micobacterias, y bacterias Gram negativas relacionadas con hábitats acuáticos, como *Acinetobacter spp.* y *Pseudomonas spp.* en pacientes inmunocomprometidos por cáncer o SIDA.

Otros autores como Williams et al.<sup>102</sup> (1976), subrayan la importancia que tiene la mejora en la calidad de los procedimientos analíticos empleados. En efecto, el empleo de medios normalizados, con gran capacidad de recuperación, es evidente que ha influido considerablemente en el aislamiento de ciertos microorganismos que anteriormente pudieran haberse recuperado con más dificultad.

## IMPORTANCIA DE LAS SEPTICEMIAS

En la bibliografía, se barajan cifras muy variadas respecto a la frecuencia de casos de septicemia detectados en diversos países.

En EEUU se dan aproximadamente 500.000 septicemias anuales, mientras que en la antigua Alemania Federal se estimaban entre 200.000 y 250.000 casos (Helm y Stille<sup>38</sup>, 1980). Más recientemente, Washington e Ilstrup<sup>97</sup> (1986) describen 200.000 casos de septicemias en EEUU, con un porcentaje de mortalidad que se sitúa entre el 40% y el 50%.

Un estudio multicéntrico realizado en seis hospitales españoles, mostró una incidencia de 20,9 episodios sépticos por cada 1000 pacientes ingresados. El 51% de estas septicemias fueron de origen nosocomial, dando lugar a una mortalidad del 31% (Martín-Luengo, F<sup>60</sup>,1986)

Por otra parte, el aumento en la utilización de catéteres intravasculares en los protocolos terapéuticos actuales, han incrementado sensiblemente la incidencia de septicemias (Collingnon y Munro<sup>15</sup>, 1989). Stamm, en un estudio realizado en EEUU en la década de los años 70, observó que anualmente, más de 30.000 pacientes desarrollaban sepsis asociadas a la aplicación de cateteres intravasculares, dando lugar a un índice de mortalidad que oscilaba entre los 10.000 y 15.000 casos (Stamm<sup>80</sup>, 1978).

Estas cifras ya de por sí importantes, resultan alarmantes si se tiene en cuenta el bajo nivel de aislamientos del agente etiológico, que además es muy variable y que según señalan diversos autores oscila entre un entre un 10,4% y un 12,0% (Grosset<sup>35</sup>,1985), entre un

6.9 y un 8.0% (García-Rodríguez y otros<sup>32</sup>, 1987), un 8,8% (Hall et al<sup>37</sup>, 1978), un 11,3% (Beaman et al.<sup>7</sup>, 1977), y un 7,2% (Fleites et al.<sup>29</sup>, 1979).

Es decir, teniendo en cuenta el elevado índice de morbilidad y mortalidad que producen estos procesos, unido al bajo rendimiento de recuperación del agente etiológico, no es de extrañar el interés que tiene para el microbiólogo, el optimizar técnicas de recuperación, así como la investigación de otros métodos de diagnóstico, que por una parte permitan aumentar la sensibilidad y especificidad, y por otra, reducir el tiempo empleado en su realización, factor que en muchas ocasiones puede ser decisivo a la hora de evitar complicaciones fatales en los pacientes afectados de una sepsis.

## **SEGUNDA PARTE**



## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Si consideramos los principales aspectos relacionados con la realización correcta de una técnica de hemocultivo, que conduzca al aislamiento del verdadero agente causal de una septicemia, es imprescindible tener en cuenta dos grupos de parámetros : por una parte aquellos que están basados en criterios clínicos, y por otra, los que dependen de la optimización de la técnica de aislamiento empleada.

Los primeros, son inherentes al acto médico y corresponden al reconocimiento de una serie de manifestaciones clínicas (fiebre, escalofríos, hipotensión, arritmias, shock), que conducirán a la solicitud de la realización de la técnica microbiológica destinada a la recuperación del microorganismo causal, y en este sentido, un factor que puede variar el porcentaje de positividades, es el relacionado con el estado inmunitario del individuo. Así, si el aislamiento se realiza en enfermos procedentes de unidades de oncología, diálisis, hospitales de enfermedades infecciosas y en general en pacientes inmunodeprimidos, el porcentaje de positividades será probablemente más elevado que el obtenido en pacientes procedentes de hospitales generales.

Por lo que respecta a los parámetros de optimización de la técnica, al practicar un hemocultivo deben considerarse los siguientes aspectos fundamentales:

- Por una parte, la elección del momento de la toma de la muestra y el número de extracciones realizadas por episodio séptico.

- Por otra, la técnica bacteriológica utilizada, haciendo especial hincapié en el volumen de la muestra, los medios de cultivo, la existencia de terapéutica antibiótica anterior, el tipo de anticoagulante utilizado y otros componentes que puedan facilitar el desarrollo de los microorganismos.

Respecto al momento en que debe realizarse la extracción de la muestra, hay que señalar que en el caso de las bacteriemias continuas, no tiene excesiva importancia, puesto que generalmente los microorganismos se mantienen de una forma constante en la corriente sanguínea (Bennett y Beeson<sup>8</sup>, 1954). Sin embargo, es frecuente que la difusión del microorganismo al torrente circulatorio se produzca de una manera intermitente, con la consiguiente aparición de fiebre y escalofríos a partir de 30 o 60 minutos del inicio (Freeman<sup>31</sup>, 1990). En estos casos es aconsejable realizar la extracción de la muestra, como señalan Bennett y Beeson<sup>8</sup> (1954), aproximadamente una hora antes del acceso febril.

Referente al número de extracciones que deben practicarse, se recomienda más de una por episodio séptico (Aronson y Bor<sup>1</sup>, 1987), no sólo para incrementar la posibilidad del aislamiento del agente causal, sino también para confirmar bacteriemias verdaderas debidas a microorganismos que normalmente forman parte de los gérmenes contaminantes (Washington<sup>95</sup>, 1986).

En un estudio realizado por Washington en la Clínica Mayo, sobre 80 pacientes septicémicos a los que se les practicó un mínimo de tres hemocultivos seriados, mediante la siembra de 10 ml de sangre en un intervalo de 24 horas, pudo observarse que con la primera muestra se recuperaba el 80% de los microorganismos, al considerar las dos primeras resultaban positivos el 89% de los casos, mientras que realizando las tres, se aislaba el 99% de los agentes causales de las septicemias (Washington<sup>93</sup>, 1975).

Posteriormente, Weinstein en otro trabajo realizado en la Universidad de Colorado, en el que se utilizaron dos muestras de 15 ml, detectó el 91,5% de positividades al practicar únicamente el primer hemocultivo, mientras que al realizar los dos se recuperaron el 99,3% de los microorganismos (Weinstein et al.<sup>98</sup>, 1983).



En general, los datos publicados demuestran que es suficiente realizar 2 o 3 tomas por episodio séptico (Weinstein et al.<sup>98</sup>, 1983; Werner y Cobbs<sup>100</sup>, 1967; Washington<sup>93</sup>, 1975).

Respecto al volumen de sangre que debe utilizarse, hay que tener presente que en adultos, la concentración de microorganismos en sangre es generalmente baja (Henry et al.<sup>39</sup>, 1983; Kreger et al.<sup>53</sup>, 1980; Ilstrup y Washington<sup>41</sup>, 1983) y a menudo inferior a 1 ufc/ml (Arpi et al.<sup>3</sup>, 1989), y por consiguiente los volúmenes de muestra tienen una notable incidencia en el aislamiento del agente causal. Así, Arpi et al.<sup>3</sup> (1989) señalan que al pasar de 6,5-8 ml a 13-16 ml, recuperan un 17% más de microorganismos; Ilstrup y Washington<sup>41</sup> (1983), al cultivar 20 y 30 ml de sangre incrementan el aislamiento del microorganismo en un 38% y un 61% respectivamente con relación a la siembra de 10 ml; Plorde et al.<sup>71</sup> (1985) observan un incremento del 17% al pasar a cultivar de 10 ml a 20 ml de muestra, mientras que Murray<sup>65</sup> (1987) obtiene entre un 20% y un 30% más de hemocultivos positivos, si se incrementa de 10 a 20 ml el volumen de sangre cultivada.

En adultos no existe un criterio único en cuanto al volumen de muestra a cultivar. Las recomendaciones según distintos autores, oscilan entre los 10 y 30 ml de sangre, que se siembran en frascos que contienen entre 50 y 100 ml de medio de cultivo, cerrados al vacío con o sin la presencia de CO<sub>2</sub>. Arpi et al.<sup>3</sup> (1989) recomiendan la siembra de 20 a 30 ml por hemocultivo. Sin embargo, la mayoría de autores utilizan un volumen que oscila entre 10 y 15 ml (Washington<sup>93</sup>, 1975).

Por otra parte, en niños afectados de cuadros septicémicos, la concentración de bacterias viables en sangre, suele ser superior a 10 ufc/ml (Campos<sup>13</sup>, 1989). En estos casos, se requiere un volumen de sangre inferior al utilizado en adultos. La cantidad recomendada por diversos autores oscila entre 1 y 5 ml. (Franciosi y Favara<sup>30</sup>, 1972; Minkus y Moffet<sup>63</sup>, 1971; Dietzman et al.<sup>18</sup>, 1974; Welch et al.<sup>99</sup>, 1985). En este sentido, existen algunos trabajos realizados en neonatos utilizando microtécnicas con sangre capilar, obtenida mediante punción con lanceta. En uno de ellos Mangurten y LeBeau<sup>58</sup> (1977) extrajeron 0,02 ml en un tubo capilar heparinizado y lo inocularon en 2 ml de caldo triptona soja. Simultáneamente cultivaron sangre de una vena periférica, obteniendo resultados

similares por ambas técnicas. Posteriormente, Knudson y Alden<sup>48</sup> (1980), utilizando también la técnica de extracción con lanceta, recogieron 0,4 ml de sangre capilar y cultivaron 0,2 ml en un frasco aeróbico y otros 0,2 ml en un frasco anaeróbico. Al mismo tiempo, extrajeron mediante punción venosa entre 0,5 y 1 ml de sangre y la cultivaron aeróbica y anaerobicamente, observando resultados comparables.

Otro factor a considerar es la relación entre los volúmenes de sangre y de medio de cultivo. Hay que tener en cuenta, que una concentración elevada de sangre puede inhibir el crecimiento del microorganismo (Lowrance y Traub<sup>57</sup>, 1969), debido por una parte, a la capacidad bactericida de la sangre, relacionada con sus propios componentes naturales como fagocitos, inmunoglobulinas y sistema del complemento, y por otra, a posibles agentes antimicrobianos resultantes de un tratamiento antibiótico anterior a la toma de la muestra. Sin embargo, no debe olvidarse que en la sangre se encuentran también una serie de factores, que pueden contribuir al crecimiento de los microorganismos. Teniendo en cuenta estas consideraciones y de acuerdo a la experiencia de diversos autores, se recomienda una relación por cociente entre volumen de sangre y de medio de cultivo del orden de 1/5 a 1/10 (Reller et al.<sup>72</sup>, 1978), aunque esta última parece ser la óptima según Washington<sup>95</sup> (1986).

Respecto al tiempo de incubación aconsejado, tradicionalmente la mayoría de los autores recomendaban una duración de dos semanas (Kotin<sup>52</sup>, 1952; Isenberg y Berkman<sup>42</sup>, 1962; Baily y Scott<sup>5</sup>, 1989) y algunos hasta de tres (Baker<sup>6</sup>, 1962). Posteriormente Effersoe<sup>22</sup> (1965) sugiere no prolongar los cultivos más allá de una semana, al no observar diferencias significativas con relación a los resultados obtenidos al mantener el periodo de incubación durante dos o tres semanas.

Más tarde Ellner<sup>23</sup> en 1968, con la idea de confirmar los resultados hallados por Effersoe<sup>22</sup>, realizó la revisión de unos 40.000 hemocultivos efectuados durante 10 años y pudo comprobar que en ningún caso el cultivo se positivizó después del quinto día de incubación.

Una vez efectuada la siembra, Reller et al.<sup>73</sup> (1982) aconsejan

la realización de un cultivo ciego entre las 6 y las 18 horas de incubación y opcionalmente a partir de las 48 horas, además de un examen macroscópico diario de los cultivos, con el fin de observar la aparición de colonias, turbidez del medio, hemólisis y producción de gas. Ante cualquier sospecha, se aconseja la observación microscópica de preparaciones coloreadas mediante Gram o azul de metileno, o mejor con naranja de acridina, que según Mirrett et al.<sup>64</sup> (1982), incrementa notablemente la sensibilidad.

Sin embargo, si los cultivos se mantienen negativos durante 7 días y la sintomatología clínica lo sugiere, puede ser conveniente alargar el tiempo de incubación, en previsión de otros microorganismos de crecimiento más lento. En el caso de *Brucella* se aconseja una incubación de 4 a 5 semanas (Washington<sup>92</sup>, 1973); si se sospecha la presencia de *Leptospira* son suficientes 28 días en medio semisólido (Tjalma y Galton<sup>87</sup>, 1965; Gochenour et al.<sup>34</sup>, 1953) y en el caso de *Candida* y *Torulopsis* no debe suspenderse el cultivo antes de los 30 días (Roberts y Washington<sup>75</sup>, 1975). Otros microorganismos que requieren más tiempo de incubación son *Legionella*, *Coxiella*, hongos filamentosos (Washington<sup>96</sup>, 1989), *Haemophilus* y *Cardiobacterium hominis* (Washington<sup>94</sup>, 1978).

## RECUPERACION DEL MICROORGANISMO

### Técnicas tradicionales

La técnica del hemocultivo, clásicamente se ha realizado empleando un frasco cerrado al vacío (con o sin ambiente de CO<sub>2</sub>), que contiene un medio de cultivo líquido y en algunas ocasiones, además, un medio sólido adosado a una de las paredes del frasco.

Entre los medios líquidos más recomendados según los métodos convencionales, figuran una serie de caldos enriquecidos como el medio infusión de cerebro-corazón, el caldo de triptona soja, el caldo de Columbia y el medio para *Brucella*, que pueden mantenerse en aerobiosis o anaerobiosis. Sin embargo, existen una serie de medios más específicos para el aislamiento de bacterias anaerobias, entre los cuales deben destacarse el caldo tioglicolato, el caldo de tiol y el medio de Schaedler, si bien estos medios no son adecuados para el aislamiento de ciertos microorganismos tales como *Pseudomonas* y levaduras (Reller et al.<sup>73</sup>, 1982).

También se utilizan sistemas bifásicos que contienen a la vez un medio sólido y un caldo, como el frasco de Ruiz Castañeda (Ruiz Castañeda<sup>78</sup>, 1947; Caplan y Merz<sup>14</sup>, 1978; Roberts y Washington<sup>75</sup>, 1975) y más recientemente se emplea un método, en el que se combina una botella convencional y un porta-objetos recubierto de un medio de cultivo sólido (Bryan<sup>12</sup>, 1981; Pfaller et al.<sup>69</sup> 1989).

Para favorecer la recuperación de los microorganismos, los medios de cultivo suelen suplementarse con una serie de factores como hemina, gelatina, aminoácidos (cisteína, arginina), NAD,

purinas, pirimidinas y vitaminas (K<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>) (McCarthy y Bottone<sup>62</sup>, 1974).

Otro factor muy importante es el anticoagulante utilizado en los frascos de hemocultivo. La mayoría de autores recomiendan el polianetol sulfonato sódico ( SPS ) a concentraciones comprendidas entre el 0,025 y el 0,05 % (Rosner<sup>76</sup> 1968; Rosner<sup>77</sup> 1970; Eng<sup>24</sup>, 1975), entre otras razones, porque además de actuar como anticoagulante, inhibe la fagocitosis y la acción del sistema complemento sobre las bacterias (Kocka et al.<sup>49</sup>, 1972; Traub y Lowrance<sup>88</sup>, 1970).

En este mismo sentido, debe ponderarse al SPS como un agente eficaz que actúa inactivando la lisozima, favoreciendo la precipitación de las β-lipoproteínas y el fibrinógeno, y que además posee un efecto inhibitorio de diversos antibióticos aminoglicósidos, polimixinas (Kocka et al.<sup>49</sup>, 1972; Krogstad et al.<sup>54</sup>, 1981) y según Ellner<sup>23</sup> (1968) de la estreptomicina.

Ensayando una serie de antibióticos "in vitro", Kocka et al.<sup>49</sup> (1972) observaron que este polianión, disminuía la actividad de los antibióticos estreptomicina, polimixina B, kanamicina, gentamicina y neomicina, no alterando la tetraciclina, penicilina G, cefalotina sódica, vancomicina y lincomicina.

Sin embargo, el SPS puede inhibir la recuperación de algunas bacterias como *Peptostreptococcus anaerobius* (Wilkins y West<sup>101</sup>, 1976), *Neisseria gonorrhoeae* (Staneck y Vicent<sup>81</sup>, 1981) y *Neisseria meningitidis* (Eng e Iveland<sup>25</sup>, 1975). Este efecto inhibitorio puede neutralizarse añadiendo al medio entre 1% (Pai y Sorger<sup>67</sup>, 1981) y 1,2% de gelatina (Reller et al.<sup>73</sup>, 1982). Ellner<sup>23</sup> (1968) también describe un efecto inhibitorio de esta sustancia sobre *Mycoplasma hominis* tipo 1, cuando se utiliza a una concentración de 100 µg/ml.

Uno de los problemas más importantes relacionados con la eficacia del hemocultivo, reside en el aislamiento del agente causal en enfermos sometidos a terapéutica antibiótica previa a la extracción de la muestra. Para intentar neutralizar este efecto, se han diseñado diversas estrategias experimentales, como son el empleo de β-lactamasas o complejos de tiol para inhibir los

antibióticos  $\beta$ -lactámicos, (Murray y Niles<sup>66</sup>, 1982), ácido p-aminobenzoico para contrarrestar el efecto antimicrobiano de las sulfonamidas, SPS al 0,025%, que como se ha indicado anteriormente, es un antagonista de diversos antibióticos.

Finalmente, desde 1981 existe la posibilidad de eliminar los agentes antimicrobianos procesando previamente la muestra en frascos que contienen una resina catiónica y otra absorbente polimérica (Antimicrobial Removal Device), que permite eliminar hasta 100 mcg de la mayoría de los antibióticos (Wallis et al.<sup>91</sup>, 1980).

### Técnicas automatizadas

En los últimos años, se han desarrollado una serie de instrumentos automatizados, que permiten detectar con mayor rapidez el desarrollo de los microorganismos en el medio.

Unos sistemas se basan en la medición del CO<sub>2</sub> formado en el interior del frasco, como consecuencia del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Para ello se utilizan diversos mecanismos como son:

- la medición de la radiactividad emitida por el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> desprendido por la población bacteriana al metabolizar sustratos marcados con el isótopo radiactivo <sup>14</sup>C (DeLand y Wagner<sup>17</sup>, 1969), permitiendo en algunos casos la identificación selectiva del microorganismo presente, tal como el *Mycobacterium* por su capacidad de metabolizar el ácido palmítico.

- la espectroscopía infrarroja en la medición del CO<sub>2</sub> desprendido en el curso del metabolismo bacteriano (Courcol et al.<sup>16</sup>, 1986; Jungkind et al.<sup>43</sup>, 1986)

- la visualización mediante un mecanismo manométrico, de los cambios de presión observados en el interior del frasco de cultivo debido a los gases desprendidos durante el metabolismo

microbiano (Freeman<sup>31</sup>, 1990).

- técnica fotocolorimétrica para la detección del CO<sub>2</sub> producido como consecuencia del desarrollo bacteriano (Thorpe et al.<sup>85</sup>,1990).

Otros sistemas detectan el desarrollo bacteriano mediante la medida del cambio de impedancia eléctrica que tiene lugar en el medio de cultivo, como consecuencia del crecimiento de los microorganismos (Hadley y Senyk<sup>36</sup>, 1975).

### Técnicas de Lisis

Actualmente, las únicas innovaciones técnicas alternativas al hemocultivo convencional, son aquellas que están basadas en los métodos de lisis-filtración y lisis-centrifugación. Básicamente consisten en la rotura de las células eucariotas mediante distintas soluciones líticas, a fin de liberar al medio las células procariotas fagocitadas, para proceder posteriormente a su recolección utilizando sistemas que van desde el paso de la solución lisada a través de un filtro de tamaño de poro adecuado (generalmente inferior a 0,45 micras), hasta una concentración de las mismas empleando la centrifugación, para proceder posteriormente a su cultivo sobre los medios sólidos y en los ambientes que se consideren más adecuados.

En este sentido, cabe señalar los estudios llevados a cabo por Braun y Kelsh<sup>10</sup> (1954), para el aislamiento de *Brucella* mediante la hemólisis y posterior filtración de la sangre, en el que si bien el planteamiento era correcto, porque la idea fundamental se basaba en separar lo antes posible a las bacterias de las sustancias antimicrobianas como antibióticos y quimioterápicos, en la práctica el procedimiento resultaba demasiado tedioso y complejo para realizarlo de manera habitual.

Un año más tarde, Tidwell y Gee<sup>86</sup> (1955) llevaron a cabo hemocultivos empleando membranas sobre las que se filtraba la sangre, presentando como principal inconveniente el escaso

volumen que conseguían filtrar.

Probablemente en este sentido, la técnica más relevante es la realizada por Farmer y Komorowski<sup>27</sup> en el año 1972, en la que se introduce como solución lítica una mezcla compuesta de carbonato sódico y Tritón X-100. Los principales inconvenientes descritos en su trabajo son los debidos al efecto antibacteriano que posee la solución lítica frente a bacilos Gram negativos e incluso algunos Gram positivos, sin descartar las dificultades que entrañaba la filtración a causa de la colmatación de los filtros.

En 1975, Sullivan, Sutter y Finegold<sup>83</sup>, basandose en los trabajos de Komorowski y Farmer<sup>51</sup> (1973), obtienen mejores resultados al modificar las concentraciones de carbonato y Tritón X-100, disminuyendo de este modo, los problemas de toxicidad directa. También utilizan un filtro de mayor superficie, practicando además lavados sucesivos con solución salina estéril, antes de proceder a su cultivo sobre agar sangre.

Posteriormente, las técnicas basadas en la filtración se ven considerablemente mejoradas por los trabajos de Zierdt<sup>103</sup> (1982a), en los que se describen soluciones líticas compuestas por Tween 20 y una mezcla de proteasas, que son menos tóxicas para los microorganismos que las empleadas en trabajos anteriores. De acuerdo a este autor, la técnica de lisis-filtración, permite que al lisarse los leucocitos se liberen las bacterias fagocitadas, recuperándose así las que aun mantienen su viabilidad. Al mismo tiempo, los antibióticos que pudieran encontrarse en la sangre del paciente, se eliminan mediante la filtración. Otra ventaja adicional muy importante, es aquella que se consigue al separarse las bacterias de anticuerpos, complemento, además de otras opsoninas y bactericidas presentes en el plasma, consiguiéndose concentrar a las bacterias sin los riesgos debidos a los agentes inhibidores. Esta metodología es poco práctica, por lo que no ha llegado a comercializarse. No obstante, su efectividad viene avalada por una serie de publicaciones como las de Komorowski y Farmer<sup>51</sup> (1973), Zierdt et al.<sup>104</sup> (1982b), Lamberg et al.<sup>55</sup> (1983) y Gill et al.<sup>33</sup> (1984).

Por otra parte, a partir de 1976, Dorn, Haynes y Burson<sup>19</sup> partiendo de los resultados esperanzadores obtenidos mediante la



técnica de filtración, investigaron la utilidad de la centrifugación en el aislamiento de los microorganismos de la sangre, empleando para ello como método alternativo al hemocultivo convencional, la centrifugación sobre una capa hipertónica de alta densidad que contiene gelatina y sacarosa, de una muestra problema previamente lisada mediante una solución de proteasas. Según estos autores, su método presenta, además de las ventajas del sistema de filtración, una breve exposición al ambiente atmosférico, facilitando con ello la recuperación de los microorganismos anaerobios y de otros organismos de crecimiento complicado como son las formas L y *Mycoplasmatales*, a causa del efecto protector que proporciona la fase hipertónica.

Esta técnica es mejorada a partir de 1978 por el propio Dorn y Smith<sup>20</sup>. Probablemente, su mayor mérito consistió en el grado de simplificación conseguido. La muestra de sangre se introduce en un tubo especial que contiene SPS y una solución lítica basada en proteasas, además de un compuesto de alta densidad para mitigar el efecto de la centrifugación sobre la bacteria. Tras la centrifugación, el sedimento se cultiva en un medio sólido.

En los estudios realizados por Gill et al.<sup>33</sup> (1984) se comparan las técnicas de lisis-filtración y lisis-centrifugación con la clásica de frasco cerrado (BHI). Sobre un total de 3111 individuos, el mayor porcentaje de recuperación, se obtuvo utilizando la técnica de lisis-centrifugación (7,4%), seguida del hallado por el método de lisis-filtración (6,9%) y resultando en ambos casos superior al porcentaje alcanzado por la metodología convencional (6,0%). Estos estudios demuestran un incremento de recuperación sobre la técnica clásica (BHI), del 15 % para el caso de la lisis-filtración y de un 23.3 % en la lisis-centrifugación.

Otros datos interesantes a este respecto, se deben a Kelly et al.<sup>44</sup> (1983a), en un estudio comparativo entre la técnica de lisis-centrifugación y la de frasco bifásico, compuesto por agar y caldo triptona soja, que fué realizado con 3.129 hemocultivos. De 272 microorganismos recuperados, el 78% fué detectado por la primera técnica, mientras que con el empleo de la segunda, solo detectó el 69% de ellos. En otro estudio, este mismo autor (Kelly et al.<sup>45</sup>, 1983b), mediante lisis-centrifugación recupera el 89% de las bacterias, frente al 73 % al emplear la técnica de cultivo en caldo.

En la bibliografía existen gran cantidad de trabajos que demuestran la eficacia de la técnica de lisis-centrifugación. En general, los resultados más espectaculares se dan en la recuperación de *St. aureus* (Walker et al.<sup>90</sup>,1986) y hongos (Henry<sup>39</sup>, 1983; Auckenthaler<sup>4</sup>, 1984). En otro trabajo realizado con más de 7.000 cultivos, Kiehn et al.<sup>47</sup>(1983), obtuvieron los mejores resultados en el aislamiento de enterobacterias y hongos, al utilizar el método de lisis-centrifugación, mientras que por el sistema convencional se obtuvo una mejor recuperación de *Streptococcus spp.* y *Pseudomonas spp.* De la misma manera, Brannon et al.<sup>9</sup> (1985), obtienen mayor porcentaje de recuperación de enterobacterias, *Staphylococcus spp.* y levaduras por la técnica de lisis- cetrifugación, que al utilizar la técnica del frasco con lectura radiométrica. Sin embargo, esta última ofrece mejores resultados que la anterior para el caso de *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.* y bacterias anaerobias.

Henry<sup>39</sup> (1983), también observa una mayor recuperación de neumococos y anaerobios utilizando la técnica del frasco cerrado, en comparación a la obtenida mediante el método de lisis-centrifugación. En este mismo sentido, Arpi et al.<sup>2</sup> (1988), al comparar la técnica de lisis-centrifugación con la convencional, obtienen mejores resultados para el caso de *Staphylococcus aureus* utilizando la primera, mientras que la segunda se muestra más efectiva en el aislamiento de neumococos.

## **TERCERA PARTE**



## MODELOS DE ESTUDIO EXPERIMENTAL

Históricamente se han utilizado una serie de modelos de trabajo, que van desde la realización de hemocultivos simulados "in vitro", hasta la inducción de bacteriemias experimentales provocadas en animales, mediante la inoculación de una suspensión de microorganismos.

### In vitro

Autores como Sullivan et al.<sup>84</sup> (1975) y Lamberg et al.<sup>55</sup> (1983) han utilizado un procedimiento consistente en la siembra de una muestra de sangre previamente contaminada artificialmente.

Este modelo, desde nuestro punto de vista, tiene el inconveniente de no reproducir las condiciones naturales, puesto que el huésped, al no haber establecido ningún contacto con el microorganismo, no desencadena las respuestas inmunológicas que tienen lugar como consecuencia de la infección y que pueden afectar a la recuperación del agente causal.

### In vivo

Algunos especialistas como Zierdt et al.<sup>104</sup> (1982) han utilizado el modelo "in vivo" inoculando por vía endovenosa, concentraciones conocidas ( $10^6$  ufc/ml) de diferentes

microorganismos, a una población de animales de experimentación, realizando una extracción de sangre y sembrando volúmenes de muestra de 0,1 ml, 0,5 ml y 5 ml en frascos con 50 ml de medio de cultivo. Estos autores realizaron las tomas de muestras entre los 30 y 60 minutos de la inoculación del microorganismo, puesto que según ellos las realizadas con anterioridad resultaron siempre positivas, mientras que las tardías resultaron siempre negativas.

### **Modelo propio**

Para nosotros, los modelos propuestos por los autores anteriormente citados, no cumplen todos los requisitos que consideramos importantes para la comprensión del fenómeno séptico y que consisten en:

- El empleo de un método "in vivo" que reproduzca una respuesta completa de los mecanismos inmunológicos del huésped infectado.

- La inoculación de una cantidad de microorganismos adecuada al peso del animal.

- El mantenimiento de una relación entre los volúmenes de sangre a sembrar y de medio de cultivo, dentro de los límites aconsejados por diversos autores.

- La realización de varias extracciones en los tiempos más adecuados.

- Repetir la experiencia al cabo de un tiempo, a fin de que el animal adquiera un cierto grado de inmunización y reproduzca una situación similar a la que se da en las infecciones de repetición.

- La determinación paralela de otros parámetros que informen acerca del estado inmunológico del animal.

Para ello, el modelo desarrollado por nosotros comporta la

inoculación de una concentración definida de microorganismos de acuerdo al peso del animal, la obtención de muestras en estado basal y a las 1/2, 2, 24 y 96 horas, así como la repetición de la inoculación y de las extracciones tras treinta días de reposo (Marí, M.<sup>59</sup>, 1992).

En nuestro trabajo, pudimos comprobar en primer lugar, que la inoculación de una concentración de  $10^6$  ufc de los tres microorganismos ensayados (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) era adecuada para la inducción de una sepsis experimental en conejos de peso comprendido entre 2 y 2,5 Kg.

Contrariamente a los resultados obtenidos por Zierdt, que observó que a partir de la hora de la inoculación del microorganismo todos los hemocultivos resultaban negativos, en nuestro modelo obtuvimos dos comportamientos diferentes. En los conejos inyectados con *Staphylococcus aureus*, la recuperación a las dos horas de la primera inoculación en ningún caso fué inferior al 30%, aunque sí se observó un descenso progresivo hasta las 96 horas (Fig. 3). Sin embargo, en el caso de las bacterias gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, si bien se observó un descenso a las dos horas de la primera inoculación (siempre por encima del 6%), se obtuvo un aumento a las 24 horas, seguido de un descenso a las 96 (Fig. 1 y 2).

Por otra parte, el valor de este procedimiento experimental alcanza un sentido práctico interesante al repetir los ensayos una vez transcurridas cinco semanas, ya que permite valorar las posibles influencias que puede tener el estado inmunológico del individuo en la evolución del proceso séptico, mediante el estudio de hemocultivos en animales sometidos a una sensibilización previa, que en la practica puede darse, bien porqué con anterioridad el paciente hubiera sufrido un proceso infeccioso originado por este mismo microorganismo, o bien de una manera natural, como ocurre en el caso de las bacteriemias post-prandiales.

En general, podía esperarse que la recuperación del microorganismo tras la primera inoculación, fuera mayor que la obtenida tras la segunda (cinco semanas más tarde), ya que la

aparición de anticuerpos específicos, puede facilitar la destrucción de la bacteria, al favorecer ciertos mecanismos inmunológicos como la fagocitosis o la fijación del complemento.

Mediante la técnica del frasco cerrado (BHI) se observó este comportamiento, que sin embargo no se dió en el caso de la técnica de lisis (LC-4), en la que tanto a la media como a las dos horas de la segunda inoculación, se observó una mayor recuperación que la obtenida en la primera (Fig. 1, 2 y 3). Este comportamiento que contradice el concepto expuesto anteriormente, puede justificarse por el efecto opsonizante de las inmunoglobulinas específicas, que al favorecer la fagocitosis, incrementa la circulación de los microorganismos fagocitados por los fagocitos circulantes, de manera que si realizamos la extracción seguida de una lisis del fagocito, en un momento en que las bacterias no lleven fagocitadas el tiempo suficiente para que el fagolisosoma las haya podido destruir, las bacterias podrán recuperarse, con lo cual paradójicamente se habrá aprovechado un mecanismo de defensa del organismo y por lo tanto destinado a la destrucción del microorganismo, para mejorar su recuperación.



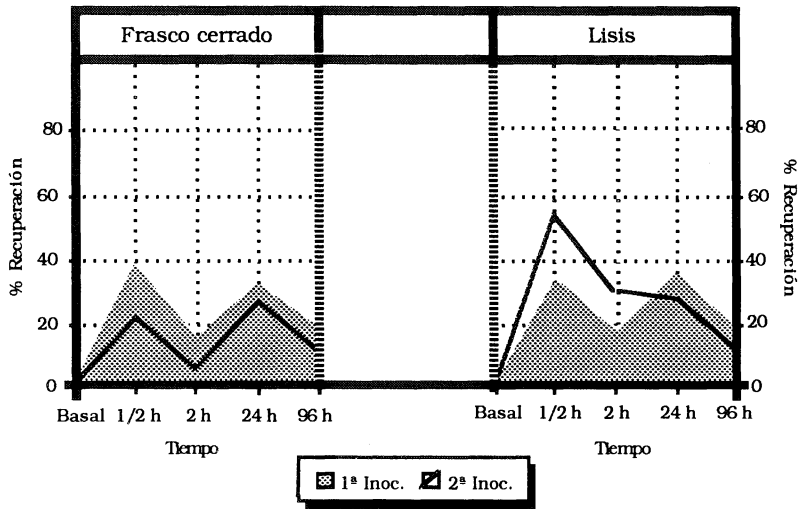


Fig.1.- Recuperación de *Escherichia coli* utilizando las técnicas del frasco cerrado (BHI) y de lisis (LC-4). La gráfica punteada y la línea continua representan la primera y segunda inoculación respectivamente.

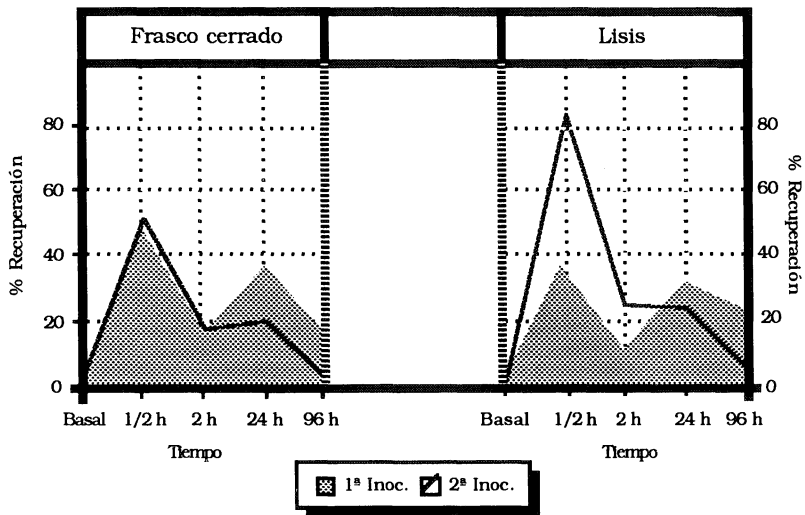


Fig.2.- Recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando las técnicas del frasco cerrado (BHI) y de lisis (LC-4). La gráfica punteada y la línea continua representan la primera y segunda inoculación respectivamente.

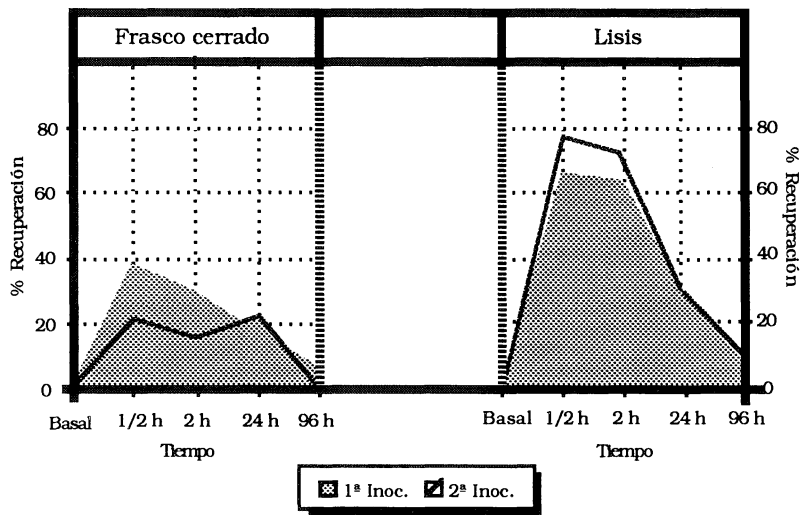


Fig g.3.- Recuperación de *Staphylococcus aureus* utilizando las técnicas del frasco cerrado (BHI) y de lisis (LC-4). La gráfica punteada y la línea continua representan la primera y segunda inoculación respectivamente.

Nuestro modelo permitió explicar una serie de resultados, en algunos casos contradictorios, descritos en la bibliografía y relacionados con la comparación de la técnica de hemocultivo en frasco cerrado y la de lisis-centrifugación.

Tal es el caso de los valores obtenidos por Dorn et al.<sup>21</sup> (1979) y Kelly et al.<sup>44</sup>(1983a) por una parte y Brannon et al.<sup>9</sup> (1985) por otra, en la recuperación de *Pseudomonas aeruginosa*. Los primeros obtuvieron los mejores resultados al aplicar la técnica de lisis-centrifugación, mientras que los segundos, la mayor recuperación del microorganismo la obtuvieron mediante la técnica del frasco cerrado (Tabla 1).

AUTORES	L-C	Frasco
Dorn, G.L. et al. (1979) Granville C. Morton Hospital, Dallas, Texas	43	31
Kelly, M.T. et al.(1983) Departament of Pathology. University of Texas Med. Branch	14	10
Brannon,P. et al.(1985) Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York	39	63

Tabla 1.- Estudio comparativo de la recuperación de *Pseudomonas aeruginosa* mediante las técnicas de lisis-centrifugación y del frasco cerrado, realizado por diversos autores.

Nuestra experiencia nos ha permitido comprobar que tras la primera inoculación con *Pseudomonas aeruginosa*, cuando los animales disponen de un nivel bajo de inmunoglobulinas específicas, la recuperación del microorganismo es mejor mediante la técnica del frasco cerrado. En cambio, tras la segunda inoculación, cuando el nivel de inmunoglobulinas específicas es más elevado, ocurre lo contrario (Fig. 4). Esto sugiere que las diferencias observadas por los autores antes citados, pueden estar relacionadas con el estudio de muestras con niveles inmunitarios distintos, hecho que ha podido confirmarse al comprobar, que mientras los grupos de Dorn y Kelly realizaron sus experiencias en hospitales generales, el de Brannon lo hicieron en enfermos procedentes de un centro oncológico, normalmente desprovistos de una capacidad de respuesta inmunitaria adecuada.

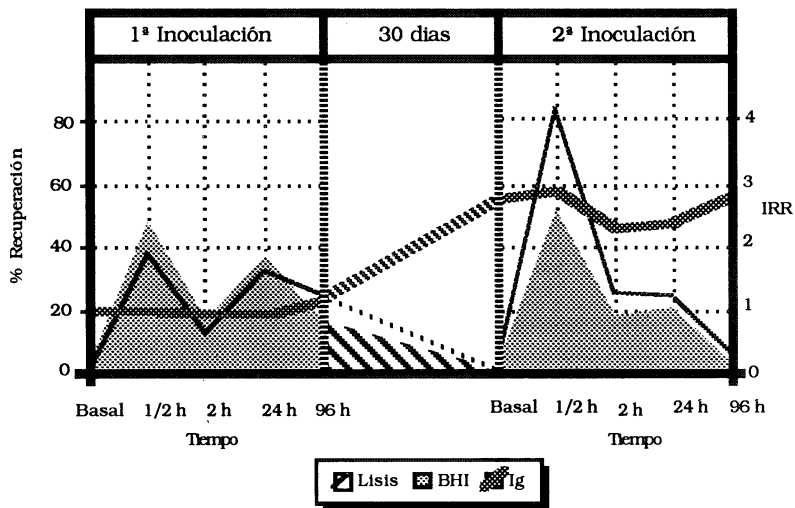


Fig. 4.- Resultados obtenidos, tras la inoculación con *Pseudomonas aeruginosa* en 85 conejos según nuestro modelo experimental. La superficie punteada representa los resultados obtenidos mediante la técnica del frasco cerrado (BHI), la línea oscura, los correspondientes a la técnica de lisis (LC-4) y la línea más clara, los niveles de inmunoglobulinas hallados mediante la técnica de ELISA.

Por otra parte, Walker y colaboradores<sup>90</sup>, en 1986, observaron que mediante la técnica de lisis-centrifugación, la recuperación de *Staphylococcus aureus*, era claramente superior a la obtenida utilizando la técnica del frasco cerrado.

A estos autores, les llamó la atención, el hecho de que las diferencias en el rendimiento de las dos técnicas, se hacían más patentes cuando se analizaban muestras procedentes de pacientes con cuadros de "bacteriemias persistentes" (Tabla 2). Los resultados obtenidos en nuestro modelo de trabajo, sugieren que este fenómeno puede estar relacionado con el incremento de los anticuerpos específicos inducido por una infección continuada, similar a la que tiene lugar en nuestra experiencia, en los animales inoculados por segunda vez con *Staphylococcus aureus*, tras 30 días de reposo (Fig. 5).

BACTERIEMIAS	L-C	Frasco	Total
Persistentes	12	4	13
Totales	70	67	77

Tabla 2.- Estudio comparativo de la recuperación de *Staphylococcus aureus* mediante las técnicas de lisis-centrifugación y del frasco cerrado, realizado por Walker et al.<sup>90</sup> (1986) en pacientes afectados de bacteriemias en general y de bacteriemias persistentes.

Tal como observamos en nuestra experiencia, tras la segunda inoculación de los animales, al aumentar la concentración de inmunoglobulinas específicas capaces de opsonizar las bacterias, se favorece su fagocitosis, permitiendo así, la circulación de una mayor cantidad de bacterias fagocitadas por PMN y monocitos. Si se realiza una extracción de sangre, seguida de un tratamiento lítico, se posibilita la recuperación de las bacterias que por no llevar suficiente tiempo fagocitadas, no han sido destruidas por el fagolisosoma celular. Es decir que, si bien en general, el incremento de inmunoglobulinas específicas, favorece la destrucción del microorganismo y por lo tanto dificulta su recuperación, en el caso de las técnicas de lisis, este efecto viene disminuido por el mecanismo expuesto anteriormente y es más efectivo, cuanto mayor es el nivel de inmunoglobulinas específicas.



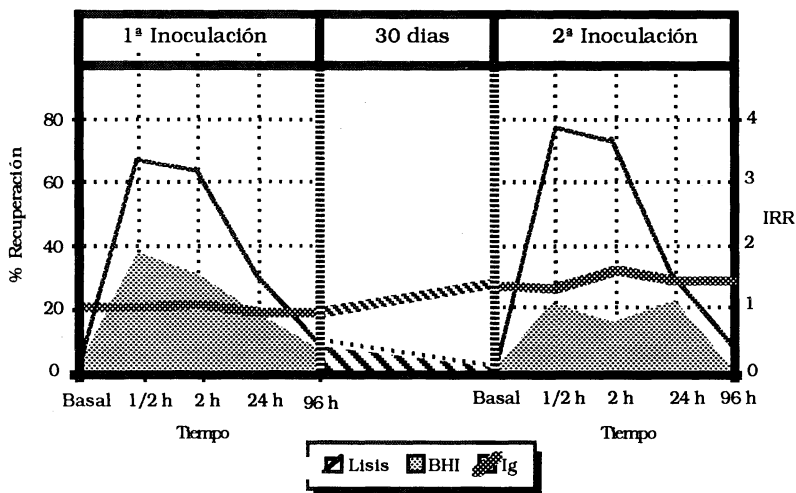


Fig. 5.- Resultados obtenidos, tras la inoculación con *Staphylococcus aureus* en 85 conejos según nuestro modelo experimental. La superficie punteada representa los resultados obtenidos mediante la técnica del frasco cerrado (BHI), la línea oscura, los correspondientes a la técnica de lisis (LC-4) y la línea más clara, los niveles de inmunoglobulinas valoradas mediante la técnica de ELISA.

Estos ejemplos dejan bien patente la ventaja que supone, en el estudio las bacteriemias mediante un modelo experimental "in vivo", el volver a realizar la inoculación del microorganismo seguida de las correspondientes extracciones de sangre, con el fin de provocar en los animales dos estados inmunitarios diferentes, que detectamos mediante la formación de inmunoglobulinas específicas, que en nuestro trabajo, hemos valorado mediante las técnicas de ELISA y Western blot.

Mediante la técnica de ELISA (Fig. 6) se observa una clara respuesta inmunitaria a las cinco semanas de la primera inoculación del microorganismo, que se traduce en el incremento de inmunoglobulinas específicas. Estas afectan a la recuperación de los microorganismos, ya que además de favorecer su fagocitosis, colabora en la activación del sistema del complemento cuya consecuencia final es la lisis de los mismos.

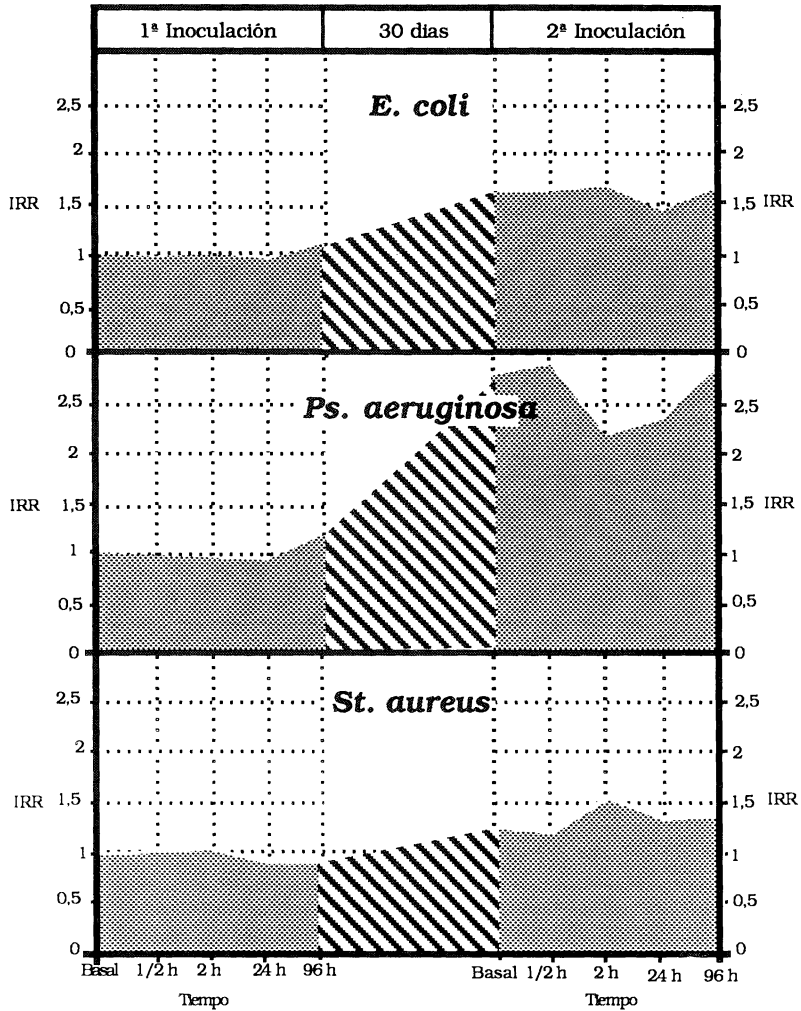
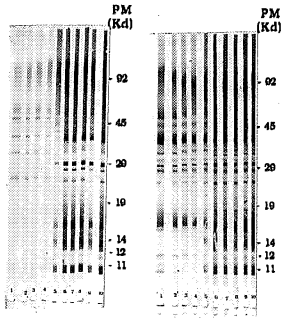
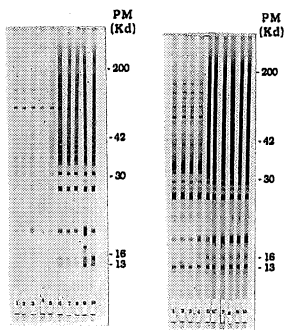


Fig. 6.- Nivel de inmunoglobulinas específicas obtenidos mediante la técnica de ELISA, en tres grupos de 80 conejos inoculados con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Como podemos observar, mientras tras la primera inoculación, los índices relativos de respuesta (IRR) se mantienen alrededor de la unidad, a las cinco semanas se observa un incremento que oscila entre 1,5 y 2,5, aproximadamente.

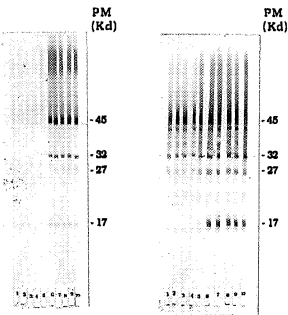
Asimismo, el estudio de las inmunoglobulinas específicas mediante Western blot (Fig. 7) nos muestra una reacción inmunitaria activa, que en el caso de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por la presencia de dos tipos de anticuerpos: aquellos que reconocen epítomos de antígenos de tipo LPS de bajo peso molecular (alrededor de 10 Kdal), y los que reconocen los epítomos de alto peso molecular (>75 Kdal), que generalmente son indicativos, bien de precursores de proteínas de menor peso molecular o de glicoproteínas, que no se observan en los individuos no inmunizados. Esto es particularmente llamativo cuando se comparan los sueros recogidos en la primera y segunda inoculación, que al estar separados cinco semanas, permiten al sistema inmunitario elaborar su defensa frente al microorganismo agresor. En la valoración de los sueros procedentes de animales inoculados con *Staphylococcus aureus*, el perfil inmunológico que se observa antes de la infección experimental es muy escaso y las inmunoglobulinas preexistentes son pocas, reaccionando generalmente frente a un antígeno predominante de un peso molecular de 45 Kdal aproximadamente. Como era de esperar, en estos animales se observa una ausencia total de reactividad frente a proteínas de bajo peso molecular, propias de LPS. Asimismo, la comparación de los distintos Western blot efectuados con muestras recogidas en tiempos sucesivos, nos permiten observar que cuando se realiza la infección experimental con *Staphylococcus aureus*, los anticuerpos específicos suelen aparecer al inicio de la segunda inoculación, mientras que en el caso de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, generalmente ya puede observarse un aumento de la reactividad específica a las 96 horas de la primera inoculación.



## ***Escherichia coli***



## ***Pseudomonas aeruginosa***



## ***Staphylococcus aureus***

Fig. 7.-El análisis de los perfiles obtenidos utilizando la técnica de Western blot, nos muestra 2 tipos de animales, unos con alta y otros con baja inmunización previa. Las cintas señaladas con los números 1 a 5, representan los perfiles correspondientes al estado basal, a la media, 2, 24 y 96 horas de la primera inoculación, mientras que los cinco siguientes (6 a 10) corresponden a los respectivos tiempos de la segunda inoculación



## **CUARTA PARTE**





## **NUEVAS TECNICAS DE POSIBLE APLICACION EN LA DETECCION DEL AGENTE CAUSAL DE LAS SEPTICEMIAS**

Con el fin de mejorar tanto la especificidad y la sensibilidad, como la rapidez en la identificación de los microorganismos, progresivamente van incorporándose metodologías basadas en una serie de técnicas de biología molecular y biotecnología, que a continuación comentamos brevemente.

Desde su descripción por Köhler y Milstein<sup>50</sup> en 1975, los anticuerpos monoclonales se han convertido en una herramienta, que facilita considerablemente el desarrollo analítico clínico y biológico. Su gran especificidad les hace extremadamente precisos para la identificación de moléculas biológicas.

En una experiencia realizada por nosotros en conejos, hemos observado que mientras la recuperación del agente causal de las septicemias sufre importantes variaciones con el tiempo, el nivel de antigenemia detectado por la técnica de ELISA empleando anticuerpos monoclonales, se mantiene más constante, proporcionando resultados más rápidos y con una positividad mayor a la hallada utilizando las técnicas de hemocultivo (Fig. 8, 9 y 10). Asimismo, la técnica de ELISA, se mostró particularmente válida en las muestras obtenidas a las 96 horas de la inoculación del microorganismo, que según nuestros resultados son precisamente las de menor recuperación del microorganismo mediante hemocultivo (Marí, M.<sup>59</sup>, 1992).

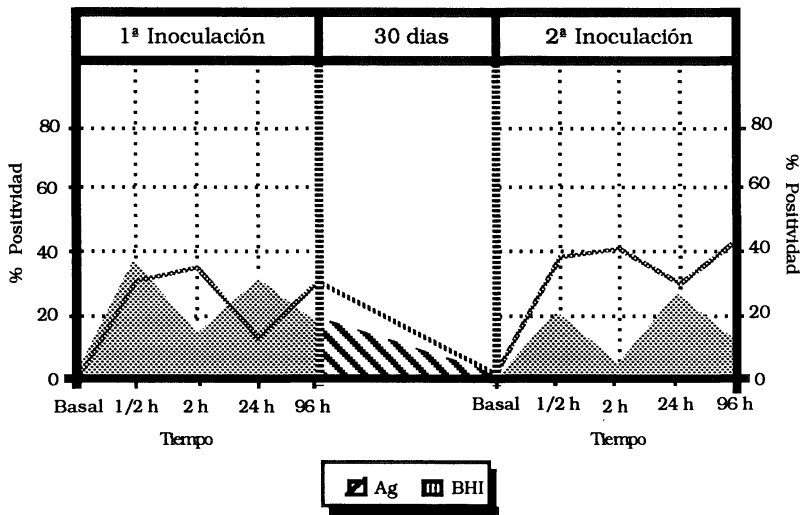


Fig. 8.- Resultados obtenidos, tras la inoculación de 80 conejos con *Escherichia coli*, según nuestro modelo experimental. La superficie punteada representa los resultados obtenidos mediante la técnica del frasco cerrado (BHI) y la línea continua los valores de antigenemia (ELISA).

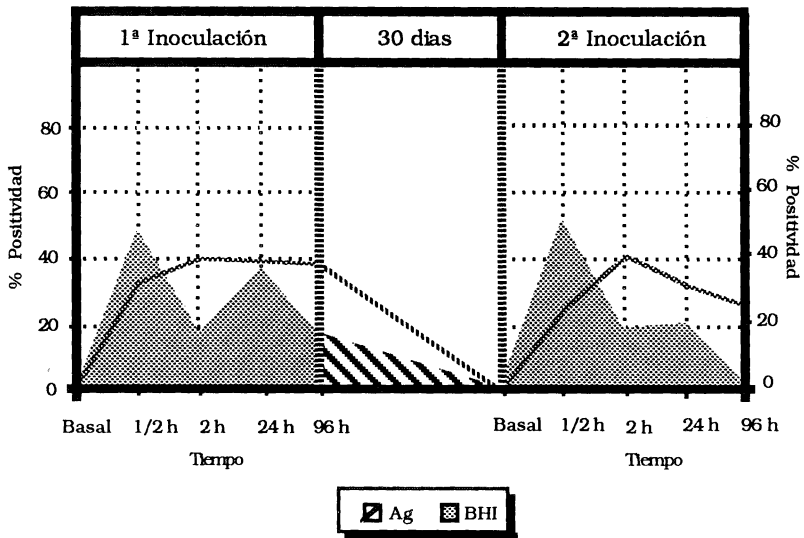


Fig. 9.- Resultados obtenidos, tras la inoculación de 80 conejos con *Pseudomonas aeruginosa*, según nuestro modelo experimental. La superficie punteada representa los resultados obtenidos mediante la técnica del frasco cerrado (BHI) y la línea continua los valores de antigenemia (ELISA).

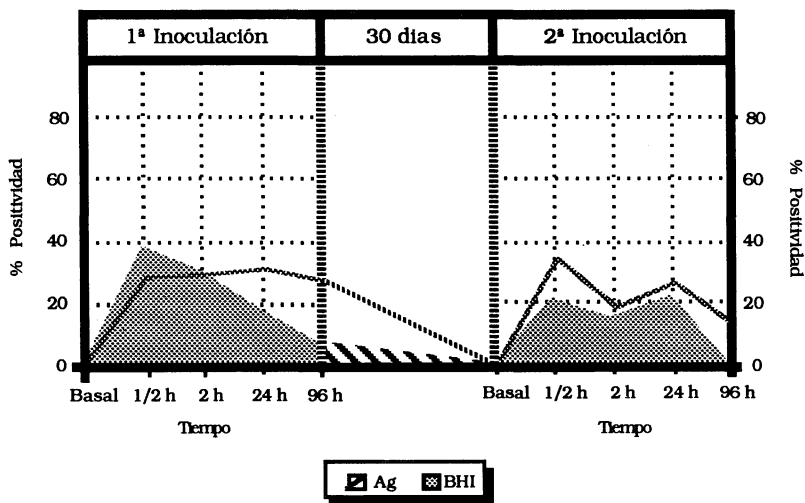


Fig. 10.- Resultados obtenidos, tras la inoculación de 80 conejos con *Staphylococcus aureus*, según nuestro modelo experimental. La superficie punteada representa los resultados obtenidos mediante la técnica del frasco cerrado (BHI) y la línea continua los valores de antigenemia (ELISA).

Por otra parte, el hecho de que los anticuerpos monoclonales se utilicen en la construcción de biosensores, sugiere que en el futuro, la implantación en cánulas endovenosas, podría llegar a permitir el seguimiento continuo de las bacteriemias, mediante la medición constante de los niveles de antigenemia.

Otra técnica biotecnológica recientemente utilizada en la identificación de los microorganismos, es la denominada PCR o reacción en cadena mediada por polimerasa.

Básicamente consiste en una técnica que permite identificar cantidades muy pequeñas de un agente infeccioso presente en una muestra clínica, mediante la replicación de una secuencia nucleotídica específica del mismo, por un proceso de síntesis de ADN, al que se ligan los denominados "primers" (que son segmentos cortos de ADN complementarios de las terminales 3' o 5' de la secuencia a amplificar) y se extienden utilizando la ADN-polimerasa para producir dos cadenas de ADN, que son copias idénticas a la secuencia original.

En cada ciclo, el número de copias de ADN se multiplica por un factor  $2^n$ , donde  $n$  es el número de ciclos, con lo que después de 30, puede obtenerse una amplificación de aproximadamente  $10^6$  veces el tamaño del fragmento específico inicial de ADN (Erlich et al.<sup>26</sup>, 1989), al que finalmente se aplica una sonda específica del microorganismo objeto del estudio.

En la actualidad, esta técnica, ya se está utilizando para la identificación de diversas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila*, de algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica, virus como los de la Hepatitis B y C, Herpes simplex 1 y 2, HIV, Citomegalovirus, y parásitos como *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis carinii*, proporcionando una gran sensibilidad y especificidad, además de un ahorro de tiempo muy importante respecto a los métodos tradicionales.



## BIBLIOGRAFIA

1. Aronson, M.R. y Bor, D.H. (1987). Blood cultures. *Ann. Int. Med.*, 1987, Vol. 106, 246-253.
2. Arpi, M., Prag, J., Schroder, S.S., Bentzon, M.W. y Frederiksen, W. (1988). Comparative analysis of two blood culture systems (Isolator and a 12-tube system) by cumulative differences in detection power at different times during incubation. *APMIS*, May 1988, Vol. 96(5), 455-463.
3. Arpi, M., Bentzon, M.W., Jensen, J. y Frederiksen, W. (1989). Importance of Blood Volume Cultured in the Detection of Bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, Sept. 1989, Vol. 8(9), 838-842.
4. Auckenthaler, R.W. (1984). Laboratory diagnosis of infective endocarditis. *Eur. Heart J.*, Oct. 1984, Vol. 5 suppl. C, 49-51.
5. Baily, W.R. y Scott, E.G. (1989). Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, S.A., 1989, pp. 213-228.
6. Baker, F.J. (1962). Handbook of bacteriological technique. Butterworths, London, 1962, pp. 179-180.
7. Beaman, K.D., Kasten, B.L. y Gavan, T.L. (1977). Rate of detection of bacteremia: retrospective evaluation of 23,392 blood cultures. *Cleveland Clinic Quarterly*, 1977, Vol. 44(3), 129-136.
8. Bennett, I.L. y Beeson, P.B. (1954). Bacteremia: A consideration of some experimental and clinical aspects. *Yale J. Biol. Med.*, Feb. 1954, Vol. 26, 241-261.

9. Brannon, P. y Kiehn, T.E. (1985). Large-scale clinical comparison of the lysis-centrifugation and radiometric systems for blood culture. *J. Clin Microbiol.*, Dec 1985, Vol. 22(6), 951-954.

10. Braun, W., and J. Kelsh. 1954. Improved method for cultivation of *Brucella* from the blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85:154-155.

11. Brooks, J.W.; Cobbs, C.G. Bacteriemia por gramnegativos. *Medicina Interna*. 2ª Edición. Tomo II. pp 1588. Ed. Stien, J.H. Editorial Salvat 1983.

12. Bryan, L.E. (1981). Comparison of a Slide Blood Culture System with a Supplemented Peptone Broth Culture Method. *J. Clin. Microbiol.*, Oct. 1981, Vol. 14(4), 389-392.

13. Campos, J.M. (1989). Detection of Bloodstream Infections in Children (1989). *Eur. J. Clin. Microbiol.*, Sep. 1989, Vol. 8(9), 815-824.

14. Caplan, L.M. y Merz, W.G. (1978). Evaluation of two commercially prepared biphasic media for recovery of fungi from blood. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, Vol. 8, 469-470.

15. Collingnon, P.J. y Munro, R. (1989). Laboratory Diagnosis of Intravascular Catheter Associated Sepsis. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, Sep. 1989, Vol. 8(9), 807-814.

16. Courcol, R.J., Fruchart, A., Roussel-Delvallze, M. y Martín, G.R. (1986). Routine evaluation of the nonradiometric Bactec NR 660 system. *J. Clin. Microbiol.*, Jul. 1986, Vol. 24(1), 26-29.

17. DeLand, F.H. y Wagner, H.N. (1969). Early detection of bacterial growth, with Carbon-14-labeled glucose. *Radiology*, Jan. 1969, Vol. 92, 154-155.

18. Dietzman, D.E., Fischer, G.W. y Schoenknecht, F.D. (1974). Neonatal *Escherichia coli* septicemia-bacterial counts in blood. *J. Pediatr.*, Jul. 1974, Vol. 85(1), 128-130.



19. Dorn, G.L., Haynes, J.R. y Burson, G.G. (1976). Blood culture technique based on centrifugation: Development phase. J. Clin. Microbiol., Mar. 1976, Vol. 3(3), 251-257.
20. Dorn, G.L. y Smith, K. (1978). New Centrifugation Blood Culture Device. J. Clin. Microbiol., Vol. 7(1), 52-54.
21. Dorn, G.L., Land, G.A. y Wilson, G.E. (1979). Improved blood culture technique based on centrifugation: clinical evaluation. J. Clin. Microbiol., Mar. 1979, Vol. 9(3). 391-396.
22. Effersoe, P. (1965). The importance of the duration of incubation in the investigation of blood cultures. Acta path. et microbiol. scandinav., 1965, 129-13
23. Ellner, P.D. (1968). System for inoculation of blood in the laboratory. Appl. Microbiology, Dec. 1968, Vol. 16(12), 1892-1894.
24. Eng, J. (1975). Effect of Sodium Polyanethol Sulfonate in Blood Cultures. J. Clin. Microbiol., Feb. 1975, Vol. 1(2), 119-123.
25. Eng, J. e Iveland, H. (1975). Inhibitory effect in vitro of sodium polyanethol sulfonate on the growth of *Neisseria meningitidis*. J. Clin. Microbiol., May 1975, Vol. 1(5), 444-447.
26. Erlich, H. A; Gibbs, R, and Kazazlan, H. (ed). Pokymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Laboartory, Cold Spring Harbor , N.Y. 1989.
27. Farmer, S., and R. A. Komorowski. 1972. Evaluation of the Sterifil lysis-filtration blood culture system. Appl. Microbiol. 23:500-504.
28. Finegold, S.M. y Baron, E.J. (1989). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, p. 224.
29. Fleites, A., de Santiago, A., Pintado, B. y Telenti, A. (1979). Revisión de 10.000 hemocultivos efectuados en pacientes en este

centro en 2,5 años. *Diag. Biol.* XXVIII (1979), 397-400.

30. Franciosi, R.A. y Favara, B.E. (1972). A single blood culture for confirmation of the diagnosis of neonatal septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, Vol. 57, 215-219.

31. Freeman, R. (1990). Blood cultures-principles, practice and pitfalls. *Reviews in Clinical Microbiology*, 92-100.

32. García Rodríguez, J.A., García Sanchez, J.E. y Muñoz Bellido, J.L. (1987). Utilidad de un nuevo proceder de hemocultivo en la detección de bacteriemias. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.*, May, 1987, Vol. 2(3), 153-156.

33. Gill, V.E., Zierdt, C.H., Wu, T.C., Stock, F., Pizzo, P.A. y MacLowry, J.D. (1984). Comparison of Lysis-Centrifugation with Lysis-Filtration and a Conventional Unvented Bottle for Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, Nov. 1984, Vol. 20(5), 927-932.

34. Gochenour, W.S., Yager, R.H., Wetmore, W. y Hightower, J.A. (1953). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Am. J. Public Health*, Apr. 1953, Vol. 43, 405-410.

35. Grosset, J. (1985). Etude comparative des hemocultures Difco et des hemocultures Merieux diphasiques (hemocultures en anaerobise). *Laboratoire Central de Bacteriologie-Virologie, Hopitaux de Paris.*

36. Hadley, W.K. y Senyk, G. (1975). Early detection of microbial metabolism and growth by measurement of electrical impedance. En: Schlessinger, D. (ed). *Microbiology Washington DC, Am. Soc. Microbiol.*, 1975.

37. Hall, M.M., Ilstrup, D.M. y Washington II, J.A. (1978). Comparison of three blood culture media with tryptic soy broth. *J. Clin. Microbiol.*, Sep. 1978, Vol. 8(3), 299-301.

38. Helm, E.B. y Stille, W. (1980). Zur Diagnostik von Septikamie. En: *Wiss. Information, Biotest Diagnostics. Frankfurt*

Med. Forum Vom 9, 10, 1980.

39. Henry, N.K., McLimans, C.A., Wright, A.J., Thompson, R.L., Wilson, W.R. y Washington II, J.A. (1983). Microbiological and Clinical Evaluation of the Isolator Lysis-Centrifugation Blood Culture Tube. *J.Clin. Microbiol.*, May 1983, Vol. 17(5), 864-869.

40. Holm, S.E. (1982). Gram-positive Microorganisms in Sepsis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 1982, 31, 68-77.

41. Ilstrup, D.M. y Washington II, J.A. (1983). The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1983, Vol. 1, 107-110.

42. Isenberg, H.D. y Berkman, J.I. (1962). Microbial diagnosis in a general hospital. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1962, Vol. 98, 647-667.

43. Jungkind, D., Millan, J., Allen, S., Dyke, J. y Hill, E. (1986). Clinical comparison of a new automated infrared culture system with the Bactec 460 system. *J. Clin. Microbiol.*, 1986, Vol. 23, 262-266.

44. Kelly, M.T., Buck, G.E. y Fojtasek, M.F. (1983). Evaluation of a Lysis-Centrifugation and a Biphasic Bottle Blood Culture System During Routine Use. *J. Clin. Microbiol.*, Sep. 1983, Vol. 18(3), 554-557.

45. Kelly, M.T., Fojtasek, M.F., Abbott, T.M., Hale, D.C., Dizikes, J.R., Boshard, R., Buck, G.E., Martín, W.J. y Matsen, J.M. (1983). Clinical evaluation of a lysis-centrifugation technique for the detection of septicemia. *JAMA*, Oct. 1983, Vol. 250(16), 2185-2188.

46. Kiehn, T.E. (1989). Bacteremia and Fungemia in the Immunocompromised Patient. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, Sep. 1989, Vol. 8(9), 832-837.

47. Kiehn, T.E., Wong, B., Edwards, F.F. y Armstrong, D. (1983).

Comparative Recovery of Bacteria and Yeasts from Lysis-Centrifugation and a Conventional Blood Culture System. *J. Clin. Microbiol.*, Aug. 1983, Vol. 18(2), 300-304.

48. Knudson, R.P. y Alden, E.R. (1980). Neonatal heelstick blood culture. *Pediatrics*, Mar. 1980, Vol. 65(3), 505-507.

49. Kocka, F.E., Magoc, T., Searcy, R.L. (1972). Action of sulfated polyanions used in blood culture on lysozyme, complement and antibiotics. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 1972, Vol. 2(6), 470-473.

50. Köhler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, Aug. 1975, Vol. 236, 495-497.

51. Komorowski, R.A. y Farmer, S.G. (1973). Rapid detection of candidemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973, Vol. 59, 56-61.

52. Kotin, P. (1952). Techniques and interpretation of routine blood cultures. *JAMA*, Aug, 1952, Vol. 149(14), 1273-1276.

53. Kreger, B.E., Craven, D.E., Carling, P.C. y McCabe, W.R. (1980). Gram-Negative Bacteremia: III. Reassessment of Etiology, Epidemiology and Ecology in 612 Patients. *Am. J. Med.*, Mar. 1980, Vol. 68, 332-343.

54. Krogstad, D.J., Murray, P.R., Granich, G.G., Niles, A.C. y Ladenson, J.H. y Davis, J.E. (1981). Sodium polyanethol sulfonate inactivation of aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Aug. 1981, Vol. 20(2), 272-274.

55. Lamberg, R.E., Schell, R.F. y LeFrock, J.L. (1983). Detection and quantitation of simulated anaerobic bacteremia by centrifugation and filtration. *J. Clin. Microbiol.*, May, 1983, Vol. 17(5), 856-859.

56. Liebermeister, C. Lecciones de patología interna y de terapéutica (enfermedades infecciosas). HDB. Pathologie-Thera.

1875. Traducido en 1888. Colección reserva de la Facultad de Medicina de Barcelona.

57. Lowrance, B.L. y Traub, W.H. (1969). Inactivation of the bactericidal activity of human serum by Liquoid (sodium polyanetholsulfonate). *Appl. Microbiol.*, Jun. 1969, Vol. 17(6), 839-842.

58. Mangurten, H.H. y LeBeau, L.J. (1977). Diagnosis of neonatal bacteremia by a microblood culture technique. *J. Pediatr.*, Jun. 1977, Vol. 90(6), 990-992.

59. Marí Tur, M., Aportación al diagnóstico de bacteriemias. Estudio experimental de sepsis inducida en conejos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Mayo 1992.

60. Martín-Luengo, F.; Bacteriemia en seis hospitales españoles. Grupo de estudio de la bacteriemia. *Med. Clin.*, 86,221-232, 1986.

61. McCabe, W.; Jackson, G. Gram-negative bacteriemia. I Etiology and ecology. *Arch. Intern. Med.* 1962. Vol 110, 845-855.

62. McCarthy, L.R. y Bottone, E.J. (1974). Bacteremia and endocarditis caused by satelliting streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.*, May 1974, Vol. 61, 585-591.

63. Minkus, R. y Moffet, H.L. (1971). Detection of bacteremia in children with sodium polyanethol sulfonate: a prospective clinical study. *Appl. Microbiol.*, Nov. 1971, Vol. 22(5), 805-808.

64. Mirrett, S., Lauer, B.A., Miller, G.A. y Reller, L.B. (1982). Comparison of acridine orange, methylene blue, and gram stains for blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, Apr. 1982, Vol. 15(4), 562-566.

65. Murray, P.R. (1987). Detection of Septicemia: Technical problems and Controversies. *Labtrends*, Feb. 1987, Vol. 1(1), 1-7.

66. Murray, P.R. y Niles, A.C. (1982). Inactivation of penicilins

by thiol broth. J. Clin. Microbiol., Nov. 1982, Vol. 16(5), 982-984.

67. Pai, C.H. y Sorger, S. (1981). Enhancement of recovery of *Neisseria meningitidis* by gelatin in blood culture media. J. Clin. Microbiol., Jul. 1981, Vol. 14(1), 20-23.

68. Pedro Pons, A., Farreras-Valentí, P., Foz-Tena, A., Surós Forns, J. y Surinyach Oller, R. (1973). Tratado de Patología y Clínica Médicas. Enfermedades infecciosas. Intoxicaciones. Enfermedades profesionales y por agentes físicos. Enfermedades alérgicas. Salvat Editores, 1973.

69. Pfaller, M.A., Barrett, M., Koontz, F.P., Wenzel, R.P., Cunningham, M.D., Rollins, N. y Darveau, R.P. (1989). Clinical Evaluation of a Direct Fluorescent Monoclonal Antibody Test for Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in Blood Cultures. J. Clin. Microbiol., Mar. 1989, Vol. 27(3), 558-560.

70. Piorry. 1874. Citado por Pedro Pons, A., Farreras-Valentí, P., Foz-Tena, A., Surós Forns, J. y Surinyach Oller, R. (1973). Tratado de Patología y Clínica Médicas. Enfermedades infecciosas. Intoxicaciones. Enfermedades profesionales y por agentes físicos. Enfermedades alérgicas. Salvat Editores, 1973.

71. Plorde, J.J., Tenover, F.C. y Carlson, L.G. (1985). Specimen volume versus yield in the Bactec blood culture system. J. Clin. Microbiol., 1985, Vol. 22, 292-295.

72. Reller, L.B., Lichtenstein, K.A., Mirret, S. et al. (1978). Controlled evaluation of the ratio of blood to broth in the detection of bacteremia by blood culture. Abstract of the Annual Meeting Am. Soc. Microbiol., 1978, nº177, p. 306.

73. Reller, L.B., Murray, P.R. y MacLowry, J.D. (1982). Blood Cultures II. Cumitech 1A, Jun. 1982, 1-11.

74. Riley, L.K. y Robertson, D.C. (1984). Ingestion and Intracellular Survival of *Brucella abortus* in Human and Bovine Polymorphonuclear Leukocytes. Infec. and Immun., Oct. 1984, Vol.

46(1), 224-230.

75. Roberts, G.D. y Washington II, J.A. (1975). Detection of fungi in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 1975, Vol. 1(3), 309-310.

76. Rosner, R. (1968). Effect of various anticoagulants and no anticoagulant on ability to isolate bacteria directly from parallel clinical blood specimens. *Am. J. Clin. Pathol.*, Feb. 1968, Vol. 49(2), 216-219.

77. Rosner, R. (1970). Comparison of a blood culture system containing Liquoid and sucrose with systems containing either reagent alone. *Appl. Microbiology*, Feb. 1970, Vol. 19(2), 281-282.

78. Ruiz Castañeda, M. (1947). A practical method for routine blood cultures in brucellosis. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 1947, Vol. 64, 114-115.

79. Schottmüller, H. (1914). *Wesen und Behandlung der Sepsis*. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.*, 1914, Vol. 31, 257-280.

80. Stamm, W.E. (1978). Infection related to medical devices. *Annals of Internal Medicine*, 1978, Vol. 89, 764-769.

81. Staneck, J.L. y Vicent, S. (1981). Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by Sodium Polyanetholsulfonate. *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 1981, Vol. 13(3), 463-467.

82. Strand, C.L. y Shulman, J.A. (1988). *Bloodstream infections. Laboratory Detection and Clinical Considerations*. ASCP Press, American Society of Clinical Pathologists, Chicago.

83. Sullivan, N.M., Sutter, V.L. y Finegold, S.M. (1975). Practical aerobic membrane filtration blood culture technique: Development of procedure. *J. Clin. Microbiol.*, Jan. 1975, Vol. 1(1), 30-36.

84. Sullivan, N.M., Sutter, V.L. y Finegold, S.M. (1975).

Practical aerobic membrane filtration blood culture technique: Clinical blood culture trial. *J. Clin. Microbiol.*, Jan. 1975, Vol. 1(1), 37-43.

85. Thorpe, T.C., Wilson, M.L., Turner, J.E., DiGuseppi, J.L., Willert, M., Mirret, S. y Reller, L.B. (1990); BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J. Clin. Microbiol.*, Jul. 1990, Vol. 28(7), 1608, 1612.

86. Tidwell, W., and L. L. Gee. 1955. Use of membrane filter in blood cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88:561-563.

87. Tjalma, R.A. y Galton, M.M. (1965). Human leptospirosis in Iowa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1965, Vol. 14(3), 387-396.

88. Traub, W.H. y Lowrance, B.L. (1970). Anticomplementary, Anticoagulatory, and Serum-Protein Precipitating Activity of Sodium Polyanetholsulfonate. *Appl. Microbiology*, Sep. 1970, Vol. 20(3), 465-468.

89. Waisbren, B.A. Bacteriemia due to negative bacilli other than the *Salmonella*. A clinical and therapeutic study. *Arch. Intern. Med.* 1957, Vol. 88, 467-488.

90. Walker, R.C., Henry, N.K., Washington, J.A. y Thompson, R.L. (1986). Lysis-centrifugation blood culture technique. Clinical impact in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch. Intern. Med.*, Dec. 1986, Vol. 146(2), 2341-2343.

91. Wallis, C., Melnick, J.L., Wende, R.D. y Riely, P.E. (1980). Rapid isolation of bacteria from septicemic patients by use of an antimicrobial agent removal device. *J. Clin. Microbiol.*, May 1980, Vol. 11(5), 462-464.

92. Washington II, J.A. (1973). Bacteremia due to anaerobic unusual and fastidious bacteria. En: *Bacteremia. Laboratory and clinical aspects*. Editado por AC Sonnenwirth, Springfield, Illinois, Charles C. Thomas Publisher, 1973, pp. 47-60.



93. Washington II, J.A. (1975). Blood Cultures: Principles and Techniques. Mayo Clin. Proc., Feb. 1975, Vol. 50, 91-98
94. Washington II, J.A. (1978). The detection of septicaemia. CRC Press, Inc., West Palm Beach, Florida (1978).
95. Washington II, J.A. (1986). Controversies in the Diagnosis and Management of Infectious Diseases, Session II: Diagnosis. Summary and Discussion. Reviews of Infectious Diseases, Sep.-Oct. 1986, Vol. 8(5), 825-827.
96. Washington II, J.A. (1989). Blood Cultures: An Overview. Eur. J. Clin. Microbiol., Sep. 1989, Vol. 8(9), 803-806.
97. Washington II, J.A. e Ilstrup, D.M. (1986). Blood Cultures: Issues and Controversies. Reviews of Infectious Diseases, Sep.-Oct. 1986, Vol. 8(5), 792-802.
98. Weinstein, M.P., Reller, L.B., Murphy, J.R. y Lichtenstein, K.A. (1983). The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. Reviews of Infectious Diseases, Ene-Feb. 1983, Vol. 5(1), 35-53.
99. Welch, D.F., Scribner, R.K. y Hensel, (1985). Evaluation of a lysis direct plating method for pediatric blood cultures. J. Clin. Microbiol., 1985, Vol. 21, 955-958.
100. Werner, A.S. y Cobbs, C.G. (1967). Studies on the bacteremia of bacterial endocarditis. JAMA, Oct. 1967, Vol. 202(3), 127-131.
101. Wilkins, T.D. y West, S.E.H. (1976). Medium-dependent inhibition of *Peptostreptococcus anaerobius* by sodium polyanetholsulfonate in blood culture media. J. Clin. Microbiol., Apr. 1976, Vol. 3(4), 393-396.
102. Williams, G.T., Houang, E.T., Shaw, E.J. y Tabaqchali, S. (1976). Bacteraemia in a London teaching hospital 1966-1975. The

Lancet, Dec. 1976, Vol. 2(7998), 1291-1293.

103. Zierdt, C.H. (1982). Blood-Lysing Solution Nontoxic to Pathogenic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, Jan. 1982, Vol. 15(1), 172-174.

104. Zierdt, C.H., Peterson, D.L., Swan, J.C., y MacLowry, J.D. (1982). Lysis-filtration Blood Culture Versus Conventional Blood Culture in a Bacteremic Rabbit Model. *J. Clin. Microbiol.*, Jan. 1982, Vol. 15(1), 74-77.

DISCURSO DE CONTESTACION POR EL  
ACADEMICO DE NUMERO EXMO. SR. DR.  
D. MANUEL SUBIRANA CANTARELL



*Hble. Sr. Presidente del Consell Insular d'Eivissa i Formentera,  
Excmo. Sr. Alcalde d'Eivissa,  
Excmo. Sr. Decano Presidente,  
Excmos. Sres. Académicos,  
Señoras y Señores:*

*Cuando el Sr. Presidente de nuestra Reial Acadèmia de Doctors me propuso hacer el discurso de bienvenida y contestación al Ilmo. Miguel Marí i Tur, tuve una de las mayores satisfacciones de mi carrera profesional y docente.*

*Si acepté gustoso el encargo de nuestro Presidente, es porqué de verdad me hacía ilusión dar la bienvenida al Dr. Marí Tur y dársela concretamente en la tribuna de nuestra gloriosa Academia que hoy se ha trasladado a la Casa de la Ciutat d'Eivissa, repleta de un numeroso y selecto público, entre los que se encuentran las autoridades del Consell Insular d'Eivissa y Formentera y del Municipio d'Eivissa, que han querido rendir homenaje en la persona de Miguel, a la saga de los farmacéuticos Tur Bonet, Marí Marí, Marí Tur y Marí Cava de Llano.*

*Mi familia y la familia del Dr. Marí tenemos, ciertamente, algunos puntos en común que querría resaltar.*

*La saga de la familia Marí, a la que pertenece Miguel, es una saga de farmacéuticos dedicada desde hace casi 100 años al estudio y a la investigación de los problemas que conlleva el tratamiento de las distintas afecciones que sufren los pacientes. El*

*abuelo materno de Miguel fué el Dr. Juan Tur Bonet, farmacéutico, y su padre es el Excmo. Dr. Don Bartolomé Marí Marí, que entre otras muchas distinciones que no voy a citar, es un miembro destacado y uno de los más veteranos de nuestra Real Acadèmia de Doctors, la cual se honra hoy en hacerle la merecida entrega del Diploma de Honor de la Institución.*

*Los dos hermanos de Miguel son asimismo farmacéuticos, y pensamos que alguno de los hijos seguirá también la tradición familiar.*

*Este primer punto de contacto entre la familia Marí y la mía, en donde los antecedentes de la tradición médica se remontan a 1807, me permite valorar lo importante que es la tradición familiar y el cultivo de una determinada rama de la ciencia, que para la saga Marí es la Farmacia y para la saga Subirana es la Medicina, y en los últimos 70 años, el cultivo de la especialidad de la Neurología.*

*Otro punto en común entre la familia Marí y la familia Subirana es el gran amor que ambos sentimos por esta Isla d'Éivissa en el cual, indiscutiblemente, la familia Marí nos lleva mucha ventaja. De todas formas debo señalar que mi padre, el Excmo. Dr. Antonio Subirana, se sentía ibicenco de adopción. Mi padre se enamoró de Ibiza en los años 30 y a partir del año 50 se afincó en San Antonio Abad, construyendo su segunda vivienda, que se diseñó respetando las características arquitectónicas de la Isla.*

*Desde su fundación, mi padre formó parte de la Asociación de Amigos de Ibiza, presidida por el Marques de Lozoya, colaborando en una serie de actos culturales y artísticos que tuvieron lugar en los años 70 en la Isla d'Éivissa.*

*Por mi parte, yo he venido a esta Isla desde los 13 años y es aquí donde empezó mi afición por el mar, por conversar y hacer amistad entre los primeros turistas, y es a partir de estos momentos cuando empecé a recorrer y a familiarizarme con esta Isla y sus habitantes, en un momento en que no existía ninguna carretera asfaltada y sólo había comunicación con Barcelona por*

*medio de un barco que hacía la travesía una vez por semana.*

*Posteriormente, en los años 60, con la llegada de los primeros "hippies" a Ibiza, se me despertó una pequeña vena artística y empecé a coleccionar algunos cuadros de pintores ibicencos, que hoy en día, con las firmas de Portmany, Calbet, Pomar, etc., presiden las habitaciones más entrañables de mi vivienda y consulta.*

*Del extenso curriculum vitae del Dr. Marí Tur quiero resaltar que se licenció en Farmacia por la Universidad Central de Barcelona en Julio de 1968.*

*En Mayo de 1992 presentó su tesis doctoral "Aportación al diagnóstico de bacteriemias. Estudio experimental de sepsis inducida en conejos", que mereció por unanimidad del tribunal, la calificación de "Cum laude".*

*Durante su vida profesional, ha participado en innumerables cursos y congresos sobre las especialidades de Bioqímica, Inmunología y Microbiología en diferentes países, entre los que cabe destacar el IV Congreso Nacional de Inmunología, celebrado Sevilla en Mayo 1980 y el IV Curso Clínico Internacional sobre Enfermedades de Transmisión Sexual, que tuvo lugar en Barcelona en Febrero de 1988, en los que paticipó como ponente, además del Curso Clínico Internacional sobre Enfermedades de Transmisión Sexual , celebrado también en Barcelona en Febrero de 1988, en el que colaboró como profesor.*

*En el año 1973, fué premiado por la Reial Acadèmia de Farmàcia de Barcelona, por su trabajo "Bases para el tratamiento racional de las anemias".*

*Es Miembro de la New York Academy of Sciences y de gran número de prestigiosas asociaciones científicas entre las que figuran la Association Internationale des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur de Lille y la American Society for Microbiology.*

*Es autor de diversas publicaciones entre las que destacan :*

- *Bases para el tratamiento racional de las anemias. Revista de la Real Academia de Farmacia de Barcelona.*

- *Importance of experimental models in the comprehension of sepsis. Journal of Clinical Microbiology.*

- *Conventional blood culture versus lysis in experimental Staphylococcus aureus bacteremic model. Journal of Clinical Microbiology.*

- *Influencia de los antiuerpos específicos en la recuperación del agente causal de las bacteriemias producidas por Staphylococcus aureus. Revista LAB 2000.*

*La conferencia magistral que acabamos de escuchar, ha revalidado para todos nosotros, el buen concepto que nos merecía el Dr. Miguel Marí, ya que ha expuesto con brevedad, sencillez y amplia documentación experimental, un tema sobre el que hasta ahora se han hecho pocos progresos, si tenemos en cuenta que desde hace muchos años, los laboratorios de análisis utilizaban técnicas tradicionales, que hoy en día deben ser revisadas a la luz de las nuevas metodologías, que además de aumentar la sensibilidad y especificidad, permitan detectar con mayor rapidez la presencia de microorganismos en las muestras clínicas.*

*En este sentido, creemos que es de gran valor la aportación del Dr. Marí en su trabajo. Por una parte, el modelo experimental que propone, a la vista de los resultados, supera en efectividad a otros modelos utilizados por otros autores, permitiendo estudiar el efecto que produce el estado inmunológico del individuo en la recuperación del agente causal de las septicemias, que según sus experiencias, es muy diferente según se utilice la técnica clásica de hemocultivo o la de lisis-centrifugación. Esta metodología, que constituye una verdadera innovación técnica del hemocultivo, ha sido utilizada en su estudio experimental empleando una mezcla lítica propia, que otros autores han utilizado posteriormente en sus trabajos de investigación presentados en una serie de congresos médicos, entre los que cabe destacar el VI<sup>TH</sup> Congres of the International Society for Peritoneal Dialysis, celebrado en Thessaloniki (Grecia) en Octubre de 1992 y el 13<sup>TH</sup> Annual*



*Dialysis Conference, que tuvo lugar en San Diego (California) en Octubre de 1992.*

*Por otra parte, su trabajo aporta una serie de resultados que demuestran la ventaja que podría suponer la aplicación de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de las septicemias.*

*Con su discurso, el recipiario ha demostrado el gran interés que hoy en día tiene profundizar sobre el estudio de las bacteriemias, que con la introducción de nuevos métodos, como los por él expuestos, puede ayudar a un mejor diagnóstico en la detección del agente causal de las septicemias y por tanto redundar en un tratamiento más precoz y contundente.*

*Con ello podemos disminuir el riesgo de mortalidad de los enfermos afectados de procesos septicémicos que hoy en día siguen siendo del orden del 20 al 40%, y que tanto los médicos como los investigadores estamos obligados a disminuir.*

*Para terminar, gracias a la Corporación que represento, a las Autoridades que con su presencia han querido resaltar este acto, y al dinámico, culto y buen amigo Miguel Marí i Tur, confiando en que esta distinción que se le otorga, sea la espoleta que le haga seguir trabajando en el arduo campo de la investigación.*

*Así las cosas, vale la pena que evoque con satisfacción plagiando al ciudadano anónimo "Ni el honor puede conseguirse sin sacrificio, ni la experiencia sin quebranto".*

*He dicho.*



## INDICE

### Contribución al estudio de las bacteriemias

Prólogo	7
PRIMERA PARTE	
Historia	11
Origen de las bacteriemias	13
Tipos de bacteriemias	15
Variación del agente causal	17
Importancia de las bacteriemias	19
SEGUNDA PARTE	
Diagnóstico de laboratorio	23
Recuperación del microorganismo	28
Técnicas tradicionales	28
Técnicas automatizadas	30
Técnicas de lisis	31
TERCERA PARTE	
Modelos de estudio experimental	37
In vitro	37
In vivo	37
Modelo propio	38
CUARTA PARTE	
Nuevas técnicas de posible aplicación en la detección del agente causal de las septicemias	57
Bibliografía	63
Discurso de contestación del Académico de número Exmo. Sr. Dr. D. Manuel Subirana Cantarell	77



## PUBLICACIONES DE LA REIAL ACADÈMIA DE DOCTORS

*Directori 1991.*

*Los tejidos tradicionales en las poblaciones pirenaicas* (Discurso de promoción a académico numerario del Excmo.Sr.D. Eduardo de Aysa Satué, Doctor en Ciencias Económicas, y contestación por el Excmo.Sr.D. José Antonio Plana Castellví, Doctor en Geografía e Historia), 1992.

*La tradición jurídica catalana* (Conferencia magistral del Académico de número Excmo.Sr.D. José Juan Pintó Ruiz, Doctor en Derecho en la Solemne Sesión de apertura de curso 1992-93, que fué presidida por SS.MM. el Rey Juan Carlos I y la Reina Sofía), 1992.

*La identidad étnica* (Discurso de ingreso del Académico numerario Excmo.Sr.D. Angel Aguirre Baztan, Doctor en Filosofía i Letras, y contestación por el Excmo.Sr.D. Josep M. Pou d'Avilés, Doctor en Derecho), 1993.

*Els laboratoris d'assaig i el mercat interior; Importància i nova concepció* (Discurso de ingreso del Académico numerario Excmo.Sr.D. Pere Miró i Plans, Doctor en Ciències Químiques, y contestación por el Excmo.Sr.D. Josep M<sup>a</sup> Simón i Tor, Doctor en Medicina y Cirugía), 1993.

*Contribuïón al estudio de las Bacteriemias* (Discurso de ingreso del Acadèmico Correspondiente Ilmo.Sr.D. Miquel Marí i Tur, Doctor en Farmacia, y contestación por el Excmo.Sr.D. Manuel Subirana i Cantarell, Doctor en Medicina i Cirugía), 1993.





REAL ACADEMIA DE DOCTORS

—Publicacions—