



Comparación del método de hemocultivo convencional con el de lisis/centrifugación modificado para el diagnóstico de fungemias

Axel Rodolfo Santiago¹, Betsy Hernández¹, Marina Rodríguez¹ e Hilda Romero²

¹Laboratorio de Micología, Hospital Universitario de Caracas y ²Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Venezuela

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar la eficacia del método de hemocultivo convencional con el de lisis/centrifugación modificado para el diagnóstico de micosis sistémicas en pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario de Caracas. De 450 muestras recibidas en un año, para ser procesadas según la técnica de hemocultivo convencional, se seleccionaron 100 para el estudio comparativo: 60 de pacientes con sida, 15 de leucémicos, diez de neutropénicos febriles, cinco de pacientes con infecciones respiratorias, cinco de diabéticos y cinco de septicémicos. Estas muestras fueron procesadas simultáneamente, de acuerdo a las dos metodologías mencionadas, realizando revisiones diarias en la búsqueda de crecimiento fúngico para su identificación definitiva. El número de aislamientos obtenidos (40) fue el mismo por ambos métodos y correspondieron a 18 *Candida albicans* (45%), diez *Candida* spp. (25%), diez *Histoplasma capsulatum* (25%) y dos *Cryptococcus neoformans* (5%). Al comparar el tiempo de crecimiento fúngico en ambos métodos, se observó que con el método de lisis/centrifugación modificado el desarrollo fúngico fue más rápido en todos los casos que con el hemocultivo convencional y al aplicar el análisis estadístico se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ellos. El método modificado de lisis/centrifugación demostró mayor eficacia, por lo cual recomendamos su empleo rutinario para el aislamiento de hongos productores de fungemias.

Palabras clave

Hemocultivo convencional, Lisis/centrifugación modificado, Fungemias, *Candida albicans*, *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*

Dirección para correspondencia:

Dr. Axel Rodolfo Santiago
Servicio de Micología
Hospital Universitario de Caracas
Caracas, Venezuela
Tel.: +58 212 7538239
Correo electrónico: axelsantiago@cantv.net

Aceptado para publicación el 13 de octubre de 2004

A comparative study of blood culture conventional method vs. a modified lysis/centrifugation technique for the diagnosis of fungemias

Summary The purpose of this work was to compare the efficacy of blood culture conventional method vs. a modified lysis/centrifugation technique. Out of 450 blood specimens received in one year, 100 were chosen for this comparative study: 60 from patients with AIDS, 15 from leukemic patients, ten from febrile neutropenic patients, five from patients with respiratory infections, five from diabetics and five from septicemic patients. The specimens were processed, simultaneously, according to the above mentioned methodologies with daily inspections searching for fungal growth in order to obtain the final identification of the causative agent. The number (40) of isolates recovered was the same using both methods, which included; 18 *Candida albicans* (45%), ten *Candida* spp. (25%), ten *Histoplasma capsulatum* (25%), and two *Cryptococcus neoformans* (5%). When the fungal growth time was compared by both methods, growth was more rapid when using the modified lysis/centrifugation technique than when using the conventional method. Statistical analysis revealed a significant difference ($p < 0.05$) between them. The modified lysis/centrifugation technique showed to be more efficacious than the conventional one, and therefore the implementation of this methodology is highly recommended for the isolation of fungi from blood.

Key words Blood culture conventional method, Modified Lysis/centrifugation, Fungemia, *Candida albicans*, *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*

Las enfermedades sistémicas están caracterizadas por el paso de microorganismos desde un foco infeccioso a la sangre y a otros órganos. La presencia de microorganismos viables en la sangre sugiere una infección activa en los tejidos y la recuperación del paciente dependerá del aislamiento temprano del agente causal [3,20]. Las fungemias son causadas principalmente por levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*, y hongos filamentosos y dimorfos como *Histoplasma capsulatum* [12,13]. Se utiliza, entre otros, el hemocultivo convencional como método diagnóstico de estas afecciones [10,14]; sin embargo, es un método muy laborioso, los resultados son tardíos, algunos falsos negativos y en caso de positividad, su interpretación es difícil [9,11,15]. El método de lisis/centrifugación, ha mostrado ser sencillo, permitiendo aislamientos rápidos de estos agentes fúngicos [16,21], aunque es muy costoso para emplearlo de rutina en nuestros hospitales. El uso de esta metodología ha sido modificado por diversos autores [2,7,8,19] y se planteó el objetivo de utilizar este método modificado con la finalidad de comparar su eficacia con el hemocultivo convencional para el diagnóstico de micosis sistémicas en pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario de Caracas.

Material y métodos

Población estudiada. Se recibieron 450 muestras para el procesamiento de hemocultivo convencional procedentes de diferentes Servicios del HUC en un período de un año. De estos, se seleccionaron 100 muestras para el estudio comparativo, distribuidos de la siguiente forma: 60 de pacientes con sida, 15 de pacientes leucémicos, diez de pacientes neutropénicos febriles, cinco de pacientes con infecciones respiratorias altas y bajas, cinco de diabéticos y cinco muestras de pacientes con septicemia.

Hemocultivo convencional. Se siguió la metodología descrita por Roberts y Washington [10]. Se utilizaron dos frascos para hemocultivo por paciente, cada uno con 60 ml de caldo soja tripticasa (Difco, EE.UU.), para adultos y 20 ml para neonatos y pediátricos, agregando 6 ml de sangre venosa a los primeros y 2 ml a los segundos. Los frascos se incubaron a 37 °C durante 30 días, en el transcurso de los cuales se realizaron dos subcultivos por cada frasco, a los cinco y diez días de incubación en dos tubos con agar glucosado de Sabouraud (SDA) y dos tubos con agar Mycosel (BBL, EE.UU.), incubándose a temperatura ambiente (TA) y a 37 °C durante 30 días, con observaciones diarias en la búsqueda de crecimiento fúngico para realizar el diagnóstico micológico siguiendo la metodología convencional correspondiente [10].

Método de lisis/centrifugación modificado. Se utilizó la técnica modificada de Canteros y cols. [8]. Se utilizaron tubos cónicos de vidrio con tapa de rosca de 15 ml de capacidad, a los cuales se les añadió 0,5 ml de saponina al 5% como agente lisante y 0,5 ml de heparina (5000 µl/ml) como anticoagulante. A cada tubo se le agregó 9 ml de sangre venosa, mezclándolo suavemente y se dejaron en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y la capa superficial del sedimento se inculó en cuatro tubos (0,25 ml en cada tubo) de SDA y Agar Mycosel incubándolos a TA y 37 °C. Se realizaron coloraciones con tinción de Wright con el fin de observar los elementos fúngicos y corroborar la lisis de los hematíes y leucocitos. Los tubos se observaron diariamente en la búsqueda de crecimiento fúngico para realizar el diagnóstico micológico correspondiente.

Análisis estadístico. Se utilizó la t-student pareada para determinar si con el método modificado de lisis/centrifugación, el crecimiento fúngico es más rápido que con el método de hemocultivo convencional [18].

Resultados

De las 100 muestras estudiadas, se obtuvieron 40 aislamientos fúngicos por ambos métodos: 18 *C. albicans*, diez *Candida* spp., diez *H. capsulatum* y dos *C. neoformans*.

De los 18 aislamientos de *C. albicans*, tres correspondieron a muestras provenientes de pacientes con sida, uno de un paciente leucémico, seis de neutropénicos febriles, dos de infecciones respiratorias altas y bajas, tres de diabéticos y tres de septicémicos. *Candida* spp. fue aislada de una muestra de un paciente con sida, tres de leucémicos, uno de neutropénicos, uno de infección respiratoria, dos de diabéticos y dos de septicémicos. Los diez aislamientos de *H. capsulatum* procedían de seis pacientes con sida, de dos pacientes con leucemias y de dos neutropénicos, y los dos aislamientos de *C. neoformans* procedían cada uno de un paciente leucémico y neutropénico (Figura 1).

Con relación al tiempo de crecimiento de los aislamientos obtenidos, se observó que con el método convencional, *C. albicans* y *Candida* spp. iniciaron su desarrollo a partir de los ocho días, mientras que con el método de lisis/centrifugación modificado el crecimiento se obtuvo a partir de los tres días de incubación. En el caso de *H. capsulatum*, hubo crecimiento a los 20 días por el método de hemocultivo convencional y a los 15 días con el segundo. *C. neoformans* creció a los 11 días cuando se usó el hemocultivo convencional y a los siete días de incubación con el método de lisis/centrifugación modificado (Figura 2).

El tiempo de crecimiento fúngico usando el método de lisis/centrifugación modificado era significativamente menor con respecto al método de hemocultivo convencional ($p < 0,05$).

Discusión

En la búsqueda de un método que permita el aislamiento rápido de hongos productores de fungemias, se comparó el método de hemocultivo convencional con el método de lisis/centrifugación modificado. Ambos métodos resultaron igualmente sensibles puesto que se obtuvo el mismo número de aislamientos fúngicos en los dos casos. *C. albicans* fue aislado de todas las patologías estudiadas, con predominio en el paciente neutropénico [5,6]. *Candida* spp. fue aislada de todas las patologías estudiadas, aunque en menor frecuencia. En cuatro pacientes con sida se aislaron levaduras del género *Candida*; estos pacientes habían permanecido hospitalizados por un tiempo prolongado, con nutrición parenteral y antibiótico-terapia múltiple, factores que predisponen la aparición de candidemia. Estos hallazgos confirman que estas levaduras son capaces de producir fungemias en las patologías incluídas y posiblemente, en otras no estudiadas en este trabajo, por lo cual la identificación de la especie es necesaria para instaurar una terapia adecuada [1,4]. Santiago y cols. [13] reportaron que *H. capsulatum* es el hongo aislado con mayor frecuencia de muestras sanguíneas en pacientes con sida en el Hospital Universitario de Caracas, datos que concuerdan con lo observado en esta investigación. *C. neoformans* fue aislado de un paciente leucémico y de un neutropénico, pero no se recuperó de pacientes con sida, como observamos en años anteriores [13]. Sin embargo este hongo se aisló de muestras de líquido cefalorraquídeo de estos pacientes con meningitis criptocócica. En nuestro hospital, la mayoría de los pacientes con sida reciben terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), tratamiento que probablemente disminuya esta infección fúngica y la histoplasmosis [17], hechos que deberían ser comprobados posteriormente. El hemocultivo convencional demostró ser un método muy laborioso para el diag-

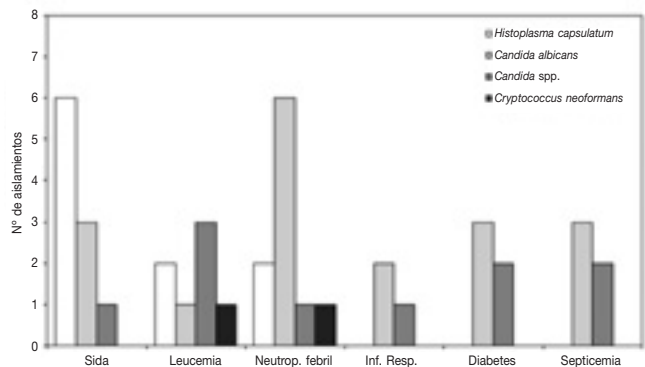


Figura 1. Hongos aislados (n = 40) de diferentes patologías usando los métodos de hemocultivo convencional y lisis/centrifugación modificado.

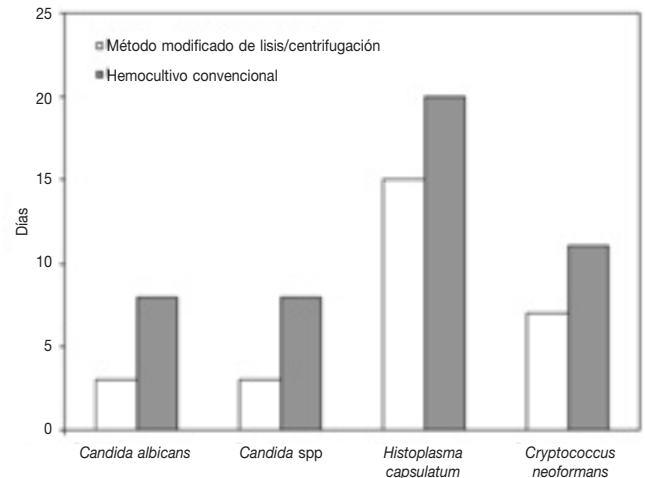


Figura 2. Comparación del tiempo de crecimiento de los aislamientos fúngicos usando los métodos convencionales y lisis/centrifugación modificado.

nóstico de fungemias, obteniéndose aislamientos muy tardíos. Con el método de lisis/centrifugación modificado el desarrollo fúngico se observó más precozmente, corroborando lo reportado previamente [2,7,8,19]. Por otra parte, el método modificado propuesto es más económico, más sencillo (ya que no requiere de subcultivos como el hemocultivo convencional), con lo cual se disminuye la alta peligrosidad que conlleva manipular este tipo de hongos. Los resultados obtenidos permiten recomendar el empleo del método modificado de lisis/centrifugación para el aislamiento de hongos productores de fungemias, sobre todo en aquellos hospitales con pocos recursos.

Los autores agradecen al Licenciado Oscar Iván Silva, Jefe del Departamento de Bioanálisis, Hospital Universitario de Caracas, Venezuela por permitirnos realizar este trabajo en el Laboratorio de Micología. A la Profesora María Rosaria Ruggiero, de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, Caracas por su asesoría en el estudio estadístico. A los Licenciados Gabriela González y Raimundo Cordero, por la realización de las figuras presentadas en este trabajo. Al Dr. Napoleón Guevara por suministrar nos los datos referente a los pacientes con sida. A todos nuestros pacientes, sin los cuales este trabajo no hubiera podido realizarse.

Bibliografía

1. Abi-said D, Anaissie E, Uzum O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1122-1128.
2. Bedout C de, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago AR, Pabón MA, Tabares A, Arango M, Restrepo A, Newell V. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de disco. *Biomédica* 2003; 23: 31-37.
3. Bianchi M, Robles M, Vitale R, Helou S, Arechavala A, Negroni R. The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related systemic mycoses: evaluation of a manual Lysis-centrifugation method. *Med Mycol* 2000; 38: 77-80.
4. Bianchi M, Negroni R, Robles AM, Arechavala N, Helou S, Cortti M. Comparative study of three blood culture systems for the diagnosis of systemic mycoses associated with AIDS. *J Mycol Med* 1997; 7: 134-136.
5. Bianchi M, Negroni R. Estudio comparativo de dos sistemas de hemocultivo en Micosis sistémicas asociadas al sida. *Rev Argent Micol* 1992; 15: 5-10.
6. Bille J, Edson R, Roberts G. Clinical evaluation of the lysis/centrifugation blood culture system for the detection of fungemias and comparison with a conventional biphasic broth blood culture system. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 126-128.
7. Bille J, Stockman L, Roberts GD, Horstmeier CD, Ilstrup DM. Evaluation of a Lysis-Centrifugation system for recovery of yeasts and filamentous fungi from blood. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 469-471.
8. Brooks RG. Prospective study of *Candida* endophthalmitis in hospitalized patients with candidemia. *Arch Inter Med* 1989; 149: 2226-2228.
9. Canteros C, Avendaño D, Rivas C, Davel G, Barrera L. Un método alternativo de lisis/centrifugación para el Hemocultivo de Hongos y Mycobacterias. Instituto de Microbiología «Dr. Carlos G. Malbran». Buenos Aires, Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, Argentina, 1997.
10. Costagliola D. Clinical Epidemiology Group from CISH. Trends in incidence of clinical manifestations of HIV infection and antiretroviral prescriptions in French university hospitals (abstract 182). In: 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, 1998.
11. Daniel W. Prueba de Hipótesis. En: Daniel W. Bioestadística, base para el análisis de las Ciencias de la Salud. México, Editorial Limusa SA 2002: 241-247
12. Henry NK, Mc Limans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA. Microbiological and clinical evaluation of the isolation lysis-centrifugation blood culture tube. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 864-869.
13. Kozinn PJ, Taschdjian CL. *Candida albicans* saprophyte or pathogen? A diagnostic guideline. *JAMA* 1966; 198: 170-172.
14. Liebowitz LD, Ashbee HR, Evans EG, Chong Y, Mallatova N, Zaidi M, Gibbs D. Global Antifungal Surveillance Group. A two years global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazol by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40: 27-33.
15. Odds FC. *Candida* and Candidosis. Philadelphia, Bailliere Tindall, 1988: 206-234.
16. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22: S89-S94.
17. Roberts GD, Horstmeier C, Hall M, Washington JA. Recovery of yeasts from vented blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 18-20.
18. Roberts GD, Washington JA. Detection of fungi in blood cultures. *J Clin Microbiol* 1975; 1: 309-310.
19. Santiago A, Hernández E, Aceituno H, Pabón R, Ferreira T. Prévalence, des mycoses chez les patients du SIDA à l'Hôpital Universitaire de Caracas (Venezuela), janvier 1985-mars 1996. *J Mycol Méd* 1997; 7: 51-52.
20. Walsh TJ, Chanock SJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis: A rationale for complementary use of culture -and nonculture- based detection systems. *Intern J Infect Dis* 1977; 1 (Suppl.1): S11-S19.
21. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-125.