

Alicia Barreales Fonseca
Magdalena Lara Pérez
Isabel Hernández Cáceres
Óscar Díez Gil

Identificación y sensibilidad rápida de cocos grampositivos en hemocultivos BacT/ALERT mediante inoculación directa en el sistema Vitek 2

Laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.

RESUMEN

Introducción: La información precoz del resultado del hemocultivo al clínico permite mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad del paciente con sepsis. Para contribuir a ello, se realizó un estudio para la identificación y sensibilidad de cultivos de sangre por inoculación directa en el sistema Vitek 2.

Material y Métodos: Se estudiaron los hemocultivos de 57 pacientes con bacteriemias monomicrobianas por cocos grampositivos. Se añadió saponina al líquido de botellas del sistema BacT/ALERT® 3D antes de la inoculación en los paneles del sistema Vitek 2. Las muestras fueron examinadas asimismo por el método estándar, consistente en la realización de las pruebas a partir del crecimiento en placa de los hemocultivos positivos.

Resultados: La comparación de los resultados obtenidos entre el método estándar y el método directo reveló una concordancia en la identificación del 82% y en la sensibilidad del 97% del total de antibióticos analizados. La tasa de errores muy graves fue tan solo del 0,5%, de errores graves del 0,5% y de errores menores del 2% en comparación con el método estándar.

Conclusión: Estos datos sugieren que la adición de saponina al líquido de las botellas del sistema BacT/ALERT® 3D antes de la inoculación en los paneles Vitek 2 conduce a una identificación y estudio de sensibilidad rápido y fiable de cocos grampositivos en muestras de sangre. Comparando con el método estándar, el método directo anticiparía en un día la obtención de resultados.

Rapid identification and susceptibility testing of Gram-positive cocci in BacT/ALERT blood cultures by direct inoculation into the Vitek 2 system

ABSTRACT

Introduction: To provide the clinician with early information about blood culture results allows a better prognosis and a reduced mortality rate of the patient with sepsis. In order to contribute to this aim, we performed a study for the identification and susceptibility profiling of positive blood cultures by direct inoculation into the automated Vitek 2 system.

Materials and Methods: Blood cultures of 57 patients with monomicrobial bacteraemia due to gram-positive cocci were evaluated. Addition of saponin to the fluid from blood culture bottles was performed prior to the inoculation of Vitek 2 system cards. The same samples were also examined with the standard method starting from agar plate grown subcultures.

Results: Comparison between the results obtained with the standard method and the direct method revealed that 82% of the samples were correctly identified and that 97% of the isolates showed a concordant antimicrobial susceptibility profile for all drugs tested. Compared to the standard method, the very major error rate of the direct method was just 0.5%, the major error rate was 0.5%, and the minor error rate was 2%.

Conclusion: These data suggest that addition of saponin to the fluid from blood culture bottles of the BacT/ALERT® 3D before inoculation of the appropriate Vitek 2 cards leads to the rapid and reliable identification and susceptibility profiling of gram-positive cocci in blood samples. Compared to the standard method, the direct method would reduce turnaround time by at least 24 hours.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del torrente sanguíneo son una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes críticamente enfermos. La instauración de un tratamiento correcto y precoz disminuye la mortalidad atribuible a estas infecciones y es un

Correspondencia:
Alicia Barreales Fonseca
Laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.
Carretera del Rosario, 145. 38010 Santa Cruz de Tenerife
Teléfonos: 922602239, 922 602169
E-mail: alison_bcn@hotmail.com

factor de gran relevancia en el pronóstico del enfermo. El enorme incremento de la resistencia a antimicrobianos de numerosos microorganismos ha limitado y dificultado el uso de tratamientos empíricos eficaces^{1,2}.

A pesar del desarrollo en los últimos años de diferentes tecnologías basadas en la detección, amplificación y/o secuenciación de los ácidos nucleicos, los hemocultivos continúan teniendo una gran relevancia como técnica diagnóstica en las bacteriemias y fungemias³. Uno de los principales motivos radica en los diferentes patrones de sensibilidad de los microorganismos que se aíslan en sangre, lo que requiere de manera indefectible la realización de estudios de sensibilidad de los microorganismos aislados a los distintos agentes antimicrobianos para poder instaurar un tratamiento efectivo.

La información precoz del resultado del hemocultivo al clínico permite la elección de fármacos de menor espectro, dosis adecuadas, cambio a tratamientos orales y/o ambulatorios, así como mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad del paciente con sepsis^{4,5}. Para ello, se está intentando en la actualidad buscar métodos que permitan disminuir los tiempos de emisión de resultados^{6,7}. Nuestra experiencia y la de otros autores en los últimos años con la inoculación directa en paneles del sistema Vitek® 2 (bioMérieux) a partir de inóculos obtenidos de frascos FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) ha sido que la identificación y antibiograma de los bacilos gramnegativos es bastante fiable y que el porcentaje de errores muy graves y errores graves en los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos es mínimo. Lamentablemente, los cocos grampositivos presentan mayores dificultades⁸⁻¹⁵. Sin embargo, los detergentes pueden mejorar la recuperación de microorganismos por la liberación de las bacterias intracelulares de los fagocitos de los pacientes. En estudios realizados por Lupetti et al.^{17,18} se vio que, en los hemocultivos donde se observaban cocos grampositivos en la tinción de gram, la adición de saponina al líquido de hemocultivos Bactec 9240® (Becton Dickinson) antes de la inoculación en los paneles del sistema automático BD Phoenix y en paneles del sistema Vitek® 2 condujo a una buena identificación y sensibilidad. Así, basado en estos hallazgos realizamos un estudio prospectivo para determinar si la adición de saponina al líquido de las botellas FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) antes de la inoculación en los paneles del sistema Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) conduce a una identificación y estudio de sensibilidad rápido y fiable de los cocos grampositivos en muestras de sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo de episodios significativos de bacteriemia monomicrobiana por cocos grampositivos en los pacientes atendidos en las plantas de hospitalización o en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria. Cada muestra se inoculó en frascos FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se incubaron en el sistema automático colorimétrico a 35-37 °C durante 5 días. Para la iden-

tificación y sensibilidad se utilizaron paneles del sistema Vitek® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

De cada paciente, solo se estudiaron las botellas aerobias que contenían cocos grampositivos y con apariencia monomicrobiana en la tinción de gram. Posteriormente se subcultivaron en placas de agar sangre y agar chocolate (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Se estudiaron los hemocultivos de 57 pacientes, de los cuales 19 (33%) fueron *Staphylococcus epidermidis*, 13 (23%) *Staphylococcus aureus*, 6 (10%) *Staphylococcus hominis*, 5 (9%) *Kocuria kristinae*, 3 (5%) *Enterococcus faecalis*, 3 (5%) *Staphylococcus haemolyticus*, 2 (3%) *Staphylococcus warneri*, 1 (2%) *Staphylococcus auricularis*, 1 (2%) *Staphylococcus capitis*, 1 (2%) *Streptococcus agalactiae*, 1 (2%) *Enterococcus faecium*, 1 (2%) *Enterococcus casseliflavus* y 1 (2%) *Streptococcus oralis* grupo *mitis*. De estos aislados 32 (56%) fueron estafilococos coagulasa-negativos. De todos los hemocultivos estudiados 14 (25%) fueron hemocultivos pediátricos y 43 (75%) hemocultivos aerobios.

Este método fue llevado a cabo como previamente describieron Lupetti et al.^{17,18} con algunas modificaciones. En resumen, 7 mL de muestra de un hemocultivo positivo fueron incubados en un tubo de fondo cónico con 0,70 µL de saponina (0,01% de concentración final) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se comparó la efectividad de los tubos de silicona utilizados en el estudio de Lupetti et al.^{17,18} frente a los tubos de fondo cónico no encontrándose diferencias significativas. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 3.500 rpm. Se decantó el sobrenadante y con el sedimento se realizó una suspensión con suero salino al 0,45% obteniendo 0,70-0,75 McFarland por el sistema Vitek Densichek colorimeter (bioMérieux). La suspensión se utilizó para inocular las tarjetas adecuadas. Para la identificación se utilizaron las tarjetas GP y para la sensibilidad en el caso de cocos grampositivos en racimo se utilizó la tarjeta AST-P588 y para cocos grampositivos en cadena la tarjeta AST-P589. Además se realizó una placa control en agar sangre, para comprobar el número de bacterias viables. El sistema Vitek 2 se utilizó para la lectura e interpretación de los resultados.

Los antimicrobianos estudiados variaron según las tarjetas utilizadas. La tarjeta AST-P588 incluye los siguientes antibióticos: benzilpenicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, quinupristina/dalfopristina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, fosfomicina, nitrofurantoína, ácido fusídico, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, mupirocina. La tarjeta AST-P589 incluye: benzilpenicilina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, quinupristina/ dalfopristina, linezolid, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, nitrofurantoína y trimetoprim/sulfametoxazol.

Análisis de datos

El estudio de identificación y sensibilidad realizado directamente de la botella (método directo), fue comparado con los resultados obtenidos directamente del crecimiento en placa (método estándar). Los resultados de identificación se clasificaron en tres categorías: resultados concordantes, no concordantes

Tabla 1

Identificación de cocos grampositivos en muestras de hemocultivo mediante el método directo.

Especie	Identificación correcta	No identificado	Identificación errónea	Total
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1			1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1		3
<i>Enterococcus faecium</i>	1			1
<i>Kocuria spp.</i>	5			5
<i>Streptococcus oralis grupo mitis</i>		1		1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1			1
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1			1
<i>Staphylococcus capitis</i>	1			1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	1	5	19
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3			3
<i>Staphylococcus hominis</i>	6			6
<i>Staphylococcus warneri</i>	2			2
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	1	1	13
Total	47	4	6	57

Tabla 2

Perfiles de sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos en muestras de hemocultivo mediante el método directo.

Antibiótico	Errores muy graves	Errores graves	Errores menores	Concordantes	Total
Bencilpenicilina				42 (100%)	42
Oxacilina	1 (3%)			36 (97%)	37
Gentamicina			2 (5%)	35 (95%)	37
Tobramicina		1	1	35 (95%)	37
Levofloxacino			6 (14%)	36 (86%)	42
Eritromicina		1 (2%)		41 (98%)	42
Clindamicina		1 (2%)		41 (98%)	42
Quinupristina/dalfopristina				42 (100%)	42
Linezolid				42 (100%)	42
Teicoplanina				42 (100%)	42
Vancomicina				42 (100%)	42
Tigeciclina				42 (100%)	42
Fosfomicina		1 (3%)	1 (3%)	35 (94%)	37
Nitrofurantoina				42 (100%)	42
Ác. Fusídico			6 (16%)	31 (84%)	37
Rifampicina				37 (100%)	37
Trimetoprim/sulfametoxazol	3 (7%)			39 (93%)	42
Mupirocina				37 (100%)	37
Total	4 (0,5%)	4 (0,5%)	16 (2%)	697 (97%)	721

Los resultados se comparan con el método estándar. En caso de discrepancias entre ambos métodos, la determinación de la sensibilidad se confirmó mediante E-test.

(diferente identificación entre los métodos analizados) y no identificados (método directo no identificó ningún microorganismo). Las discrepancias se comprobaron mediante ID32 Staph (bioMérieux) o ID32 Strep (bioMérieux). Los resultados de sensibili-

dad se agruparon en¹⁹: concordantes (en ambos métodos se obtienen interpretaciones idénticas), discrepancia muy importante o error muy grave (el método estándar indica que el microorganismo es resistente y el método directo indica que el

microorganismo es sensible), discrepancia importante o error grave (a la inversa, el método estándar indica que el microorganismo es sensible, aunque el método directo indica que es resistente) y discrepancia menor o error menor (un método indica resistente o sensible y en el otro como intermedio). Las discrepancias en los resultados fueron resueltas mediante E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para interpretar los resultados se utilizaron los puntos de corte (mg/L) recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009)^{20,21}.

RESULTADOS

Identificación

La comparación de los resultados obtenidos entre el método estándar (realizado directamente del crecimiento en placa) y el método directo (realizado a partir de la botella de hemocultivo) revela una concordancia en la identificación de 47 (82%) de los 57 cocos gram positivos estudiados (tabla 1). Se agruparon en: 45 (79%) estafilococos, 5 (9%) enterococos, 5 (9%) kocerias y 2 (3%) estreptococos. Por el método directo cuatro (7%) hemocultivos no fueron identificados, que se correspondieron con: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis* grupo mitis y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados de identificación no concordantes fueron seis (11%), todos los cuales formaban parte del género *Staphylococcus*: un *Staphylococcus epidermidis* fue identificado como *Kocuria kristinae*, tres *Staphylococcus epidermidis* como *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris*, otro *Staphylococcus epidermidis* como *Staphylococcus hominis* y un *Staphylococcus aureus* como *Gemella morbillorum*.

Sensibilidad antimicrobiana

De los 47 aislados correctamente identificados seis se excluyeron del análisis de sensibilidad, que correspondieron con un *Streptococcus oralis* grupo mitis y cinco *Kocuria kristinae*, debido a que las tarjetas del sistema Vitek 2 no dan sensibilidades a esas identificaciones. La tarjeta AST-P588 presenta una combinación de 18 antibióticos y la AST-P589 11 antibióticos. La combinación identificación-antibiograma da un resultado de 721 combinaciones analizadas. La comparación de la sensibilidad de los antimicrobianos entre el método estándar y el método directo revela que 25 (60%) de los 42 aislados resultaron concordantes en todos los antibióticos ensayados. Las discrepancias entre métodos se resolvieron mediante E-test. En cuanto a los errores muy graves se hallaron 4 (0,5%), pertenecientes principalmente a trimetoprim/sulfametoxazol y oxacilina, los errores graves 4 (0,5%) fueron tobramicina, eritromicina, clindamicina y fosfomicina y los errores menores 16 (2%) correspondieron a levofloxacin, ácido fusídico, gentamicina, tobramicina y fosfomicina. La concordancia para la mayoría de antibióticos fue superior al 95% excepto para levofloxacin, fosfomicina, ácido fusídico y trimetoprim/sulfametoxazol. El tiempo medio que tardó el sistema Vitek 2 en obtener la sensibilidad después de la inoculación para el método directo fue de

8 horas, mientras que para el método estándar fue de 10 horas. La comparación de resultados entre el método estándar y el método directo, así como el porcentaje correspondiente a cada grupo se refleja en la tabla 2.

DISCUSIÓN

Como conclusión principal de este estudio destaca que la adición de saponina al líquido de las botellas FAN del sistema BacT/ALERT® 3D, antes de la inoculación en los paneles Vitek 2, conduce a una identificación y estudio de sensibilidad rápido y fiable de cocos grampositivos en muestras de sangre. Otros autores como Lupetti et al. analizaron otros detergentes como el Triton X-100 y el Tween 20 llegando a resultados similares.

Como método estándar se utilizó el inóculo de placa mediante el sistema Vitek 2 y se comparó con el método directo. Las discrepancias se comprobaron mediante ID32 Staph (bioMérieux) o ID32 Strep (bioMérieux).

Se obtuvo una concordancia en la identificación del 82% y una concordancia en la sensibilidad del 97% del total de antibióticos analizados. El 7% de los microorganismos no fueron identificados y el 11 % fueron mal identificados. En el análisis de sensibilidades se excluyeron aquellos microorganismos no identificados correctamente. La Food and Drug Administration (FDA) ha establecido como aceptable para los métodos de determinación de sensibilidad una tasa de concordancia global > 89,9%, incluyendo una tasa de errores graves $\leq 3\%$ y una tasa de errores muy graves $\leq 1,5\%$ ²². En nuestro estudio, los errores muy graves obtenidos fueron del 0,5%, pertenecientes principalmente a trimetoprim/sulfametoxazol y oxacilina, los errores graves (0,5%) fueron con tobramicina, eritromicina, clindamicina y fosfomicina y los errores menores (2%) correspondieron a levofloxacin, ácido fusídico, gentamicina, tobramicina y fosfomicina. No se observó ningún error y por tanto se obtuvo una concordancia del 100% para vancomicina, teicoplanina y linezolid que son los antibióticos más frecuentemente utilizados para el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por estafilococos y enterococos.

En resumen, con este método se contribuye a dar una información precoz al clínico sobre la identificación y sensibilidad de cocos grampositivos en muestras de hemocultivo al anticipar en un día la obtención de resultados. Esto permite la elección de antibióticos de menor espectro y en dosis adecuadas, el cambio a tratamientos orales y/o ambulatorios, así como mejorar el pronóstico y reducir la mortalidad del paciente con sepsis. Es importante destacar la necesidad de nuevos estudios para poder analizar correctamente aquellos microorganismos no identificables y aquellos microorganismos para los que el sistema Vitek 2 no ofrece antibiograma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pascual A. Hemocultivos y líquido cefalorraquídeo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(Supl.2): 37-43.
2. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1415-8.

3. Prats G, Sánchez F. El hemocultivo en los tiempos de la reacción en cadena de la polimerasa. *Med Clin (Barc)* 1997; 108: 534-6.
4. Bearman GM, Wenzel RP Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 2005; 36: 646-59.
5. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1757-62.
6. Waites KB, Brookings ES, Moser SA, Zimmer BL. Direct bacterial identification from positive BacT/Alert blood cultures using MicroScan overnight and rapid panels. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 21-6.
7. Özenci V, Tegmark-Wisell K, Lundberg C, Wretling B. Rapid culture and identification: a practical method for early preliminary laboratory diagnosis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 14: 174-89.
8. Waites KB, Brookings ES, Moser SA, Zimmer BL. Direct bacterial identification from positive BacT/Alert blood cultures using MicroScan overnight and rapid panels. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 21-6.
9. Chen J-R, Lee S-Y, Yang BH, Lu JJ. Rapid identification and susceptibility testing using the Vitek 2 system using culture fluids from positive BacT/Alert blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41: 259-64.
10. de Cueto M, Ceballos E, Martínez-Martínez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3734-8.
11. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolfhagen MJ Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 7-11.
12. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX automated microbiology system for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1466-70.
13. Fontanals D, Salceda F, Hernández J, Sanfeliu I, Torra M. Evaluation of wider system for direct identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 693-5.
14. Hansen DS, Jensen AG, Nørskov-Lauritsen N, Skov R, Bruun B. Direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI+/GNSGA). *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 38-44.
15. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4705-7.
16. Murray PR, Spizzo AW, Niles AC. Clinical comparison of the recoveries of bloodstream pathogens in Septi-Chek brain heart infusion broth with saponin, Septi-Chek tryptic soy broth, and the isolator lysis-centrifugation system. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 901-5.
17. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria A. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 89-95.
18. A. Lupetti, S. Barnini, B. Castagna, P. H. Nibbering, M. Campa. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. 2010; 16: 986-91.
19. Thornsberry C, Gavan TL. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests. In: Lennette EH, Balows AL, Hausler Jr WJ, Truant JP, editores. *Manual of Clinical Microbiology*. 3th ed. Washington, DC: ASM Press; 1980. p. 491-4.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition. CLSI document M7-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
22. Ferraro RJ, Jorgensen JH. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2003.