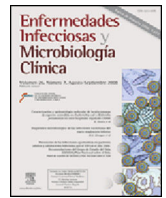




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Identificación y determinación de sensibilidad a antibióticos de aislados de hemocultivos a partir de subcultivos de corta incubación

Mónica Ballester-Téllez^{a,*}, Esther Recacha^a, Marina de Cueto^{a,b} y Álvaro Pascual^{a,b}

^a Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Virgen Macarena-Virgen del Rocío, Sevilla, España

^b Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 11 de septiembre de 2015

Aceptado el 8 de enero de 2016

On-line el 16 de febrero de 2016

Palabras clave:

Hemocultivo

Bacteriemia

Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization

Time-of-Flight

Sensibilidad a antibióticos

R E S U M E N

Introducción: La espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) permite la identificación rápida de los microorganismos causantes de bacteriemia. Se requieren métodos fiables y rápidos que permitan acortar el tiempo necesario hasta disponer de los resultados de sensibilidad a antibióticos de los aislados de hemocultivos.

Métodos: Se evalúa la fiabilidad de un método que combina la identificación con MALDI-TOF y el estudio de sensibilidad en paneles de microdilución inoculados a partir de un subcultivo incubado durante solo 4 h.

Resultados: La concordancia de los resultados de sensibilidad a antibióticos de la técnica evaluada frente a la técnica de referencia fue del 99,3%, sin que se observaran errores máximos.

Conclusión: La inoculación de paneles de microdilución a partir de un subcultivo de solo 4 h de incubación es un método fiable y fácil de realizar que permite acortar el tiempo de informe de hemocultivos positivos.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Identification and antimicrobial susceptibility testing of positive blood culture isolates from briefly incubated solid medium cultures

A B S T R A C T

Introduction: Mass spectrometry *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) helps in the rapid identification of microorganisms causing blood stream infection. Rapid and reliable methods are required to decrease the turnaround time for reporting antimicrobial susceptibility results from blood culture isolates.

Methods: An evaluation was performed on the reliability of a method for antimicrobial susceptibility testing of positive blood culture isolates from briefly incubated solid medium cultures.

Results: The agreement between the evaluated and standard methods was 99.3%. The major and minor error rates were 0.4% and 0.3%, respectively, and no very major errors were observed.

Conclusion: The inoculation of briefly incubated solid medium cultures into antimicrobial susceptibility testing panels is an easy and reliable technique, and helps to decrease the turnaround time for reporting antimicrobial susceptibility results of positive blood cultures.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Bloodculture

Bacteremia

Matrix-Assisted Laser

Desorption-Ionization Time-of-Flight

Antimicrobial susceptibility

Introducción

La infección del torrente sanguíneo es una causa importante de morbilidad¹. El hemocultivo continúa siendo la técnica de referencia para el diagnóstico etiológico de bacteriemia, permitiendo además el estudio de sensibilidad de los aislados². La rápida

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: m.ballester.t@gmail.com (M. Ballester-Téllez).

información de estos resultados permite la instauración precoz de un tratamiento antibiótico adecuado que mejora el pronóstico del paciente séptico^{3,4}.

La espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) es una técnica rápida y fiable para la identificación bacteriana^{5,6}. Su realización directamente a partir de hemocultivos positivos reduce considerablemente el tiempo de obtención de resultados^{7,8}. Se han utilizado estrategias que combinan la identificación con MALDI-TOF y la inoculación de paneles de antibiograma directamente del frasco del hemocultivo positivo; sin embargo, los protocolos publicados incluyen diferentes pasos de centrifugación y lavado que resultan laboriosos para ser implementados en la rutina del laboratorio⁸⁻¹¹. Se han comunicado buenos resultados combinando la identificación con MALDI-TOF con la inoculación de paneles de microdilución a partir de subcultivos incubados durante cortos periodos de tiempo^{12,13}.

Con el objetivo de disminuir el tiempo de informe de los hemocultivos positivos, en el presente trabajo evaluamos la fiabilidad de los resultados de sensibilidad obtenidos con paneles del sistema WIDER (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) inoculados a partir de un subcultivo de 4 h de incubación.

Métodos

Durante un periodo de 3 meses (enero-marzo 2015) se han estudiado 138 hemocultivos consecutivos positivos correspondientes a 138 pacientes diferentes. Los hemocultivos fueron procesados con el sistema BD BACTEC™ FX (Becton Dickinson, Maryland, EE. UU.). A los frascos positivos se le realizó tinción de Gram y subcultivo en agar chocolate (37 °C, 5%CO₂).

Después de 4 h de incubación, se realizó un barrido del crecimiento en agar chocolate con una espátula de madera y se realizó la identificación con el sistema MALDI-TOF (Bruker, MALDI Biotyper 3.0) mediante la técnica de transferencia directa a placa con ácido fórmico^{6,8,12}. Se consideró aceptable un *score* > 1,7.

Cuando la identificación tuvo un *score* aceptable, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por técnica de microdilución en paneles WIDER MIC/IDGP y MIC/IDGN para bacterias grampositivas y gramnegativas, respectivamente. Para la inoculación de los paneles se preparó una suspensión bacteriana a partir del subcultivo de 4 h. Se utilizó el sistema de inoculación Prompt™ Inoculation System Wands, siguiendo instrucciones del fabricante. Para comprobar la pureza del inóculo se realizó siembra en agar sangre de 10 µl de la suspensión bacteriana. Los paneles fueron incubados a 37 °C, realizándose la lectura después de 14-18 h de incubación.

En paralelo, tras 24 h de incubación, a partir de las colonias aisladas en el medio agar chocolate se realizó la inoculación estandarizada de los aislados en los mismos paneles WIDER. Los resultados obtenidos con esta técnica se han considerado como referencia para evaluar los obtenidos a partir del subcultivo de 4 h.

Para comparar los resultados, las CMI obtenidas se han transformado en categorías clínicas (sensible, intermedio, o resistente) de acuerdo con el sistema experto de WIDER que aplica los criterios del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI)¹⁴. Los resultados obtenidos con la técnica evaluada con respecto a la técnica estándar se han clasificado como concordantes (interpretación idéntica en ambos métodos), errores máximos (falsa sensibilidad), errores mayores (falsa resistencia) y errores menores (sensible/resistente vs. intermedio).

Los paneles WIDER empleados permiten la identificación del aislado; sin embargo, la fiabilidad de MALDI-TOF como técnica de identificación ha sido suficientemente evaluada y nuestro objetivo fue únicamente evaluar la fiabilidad de los resultados de sensibilidad obtenidos a partir del subcultivo de 4 h de incubación. En

Tabla 1

Agentes causales de bacteriemia identificados mediante MALDI-TOF (*score* > 1.7)

Etiología	Microrganismos, n (%)
<i>Cocos grampositivos</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (42,8)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (23,8)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (23,8)
<i>Enterococcus faecium</i>	2 (9,5)
Total	21 (100)
<i>Bacilos gramnegativos</i>	
<i>Escherichia coli</i>	51 (52,0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14 (14,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 (8,1)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6 (6,1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5 (5,1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4 (4,0)
<i>Proteus mirabilis</i>	3 (3,0)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (1,0)
<i>Aeromonas veronii</i>	1 (1,0)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (1,0)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (1,0)
<i>Proteus vulgaris</i>	1 (1,0)
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1 (1,0)
<i>Serratia marcescens</i>	1 (1,0)
Total	98 (100)

este sentido, no se han evaluado discrepancias en la identificación entre los sistemas MALDI-TOF y WIDER. Cuando se encontró alguna discrepancia en la identificación, se introdujo manualmente en el sistema la identificación obtenida con MALDI-TOF.

Resultados

De los 138 hemocultivos estudiados, 19 fueron excluidos. En 9 aislados (2 *Bacteroides* spp., un *Streptococcus pneumoniae*, 3 estafilococos coagulasa negativa, un *Escherichia coli* y 2 cultivos polimicrobianos) no se consiguió la identificación con MALDI-TOF (*score* < 1,7) después de 4 h de incubación. Otros 6 aislados (3 *S. pneumoniae*, un *Streptococcus agalactiae*, un *Streptococcus pyogenes* y un *Listeria monocytogenes*), aunque fueron correctamente identificados, fueron excluidos porque en la rutina del laboratorio no se realiza estudio de sensibilidad por técnica de microdilución a estos patógenos. Otros 4 casos en los que se observaron levaduras en la tinción de Gram también fueron excluidos.

En 119 hemocultivos se obtuvo una identificación aceptable (*score* > 1,7) con MALDI-TOF y se realizó CMI a partir del subcultivo incubado durante 4 h: 98 (83%) fueron bacilos gramnegativos (BGN) y 21 (17%) cocos grampositivos (CGP) (tabla 1).

Solo en 3 casos (un *Citrobacter koseri*, un *Enterobacter cloacae* y un *Enterobacter sakazaki*) se observaron discrepancias en la identificación de especie entre los 2 sistemas empleados.

Para BGN se han evaluado un total de 1.522 combinaciones de antibióticos/microorganismos. Para CGP, el total de combinaciones estudiadas ha sido de 246. La concordancia entre los resultados de sensibilidad obtenidos con la técnica estándar y la técnica evaluada fue del 99,3%; la tasa de errores mayores y menores fue del 0,4 y del 0,3%, respectivamente, sin que se observaran errores máximos (tabla 2). No se observaron diferencias en las tasas de error entre las diferentes especies bacterianas incluidas. No se detectó ninguna cepa productora de carbapenemasa, y entre 3 cepas de *E. coli* productoras de betalactamasa de espectro extendido y una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina hubo una concordancia total con el método de referencia.

El informe de identificación y sensibilidad se emitió en los 119 casos estudiados en menos de 24 h desde la detección del hemocultivo positivo.

Tabla 2

Correlación entre los resultados del estudio de sensibilidad obtenidos con la técnica estándar y la técnica evaluada

Microorganismo Antimicrobiano		n	Errores mayores	Errores menores
BGN	Amikacina	98	1	
	Amoxicilina	89		
	Amoxicilina/clavulánico	89		2
	Aztreonam	97	1	
	Cefepima	97		
	Cefotaxima	90		
	Ceftazidima	98		1
	Cefuroxima	89	2	1
	Ciprofloxacino	98		
	Ertapenem	89		
	Gentamicina	98	1	
	Imipenem	98		
	Meropenem	98		
	Piperacilina/tazobactam	98		
	Trimetoprim/sulfametoxazol	98	1	
	Tobramicina	98	1	
	Total	1.522	7	4
CGP	Amikacina	14		
	Amoxicilina/clavulánico	14		
	Ampicilina	7		
	Clindamicina	14		
	Daptomicina	21		
	Eritromicina	14		
	Gentamicina	14		1
	Levofloxacino	14		
	Linezolid	21		
	Oxacilina	14		
	Penicilina	14		
	Rifampicina	15		
	Teicoplanina	21		
	Trimetoprim-sulfametoxazol	14		
	Tobramicina	14		
	Vancomicina	21		
	Total	246	0	1

BGN: bacilos gramnegativos; CGP: cocos grampositivos; n: número de combinaciones de antibiótico/microorganismo probadas.

Discusión

La técnica de identificación directa con MALDI-TOF a partir de hemocultivos positivos ha demostrado ser eficaz y fiable; sin embargo, el procesamiento previo de la muestra resulta bastante laborioso. Aun en detrimento de la rapidez, para organizar mejor el flujo de trabajo, algunos autores recomiendan agrupar los hemocultivos positivos y realizar la identificación en bloques 2 veces al día¹⁵. En este sentido, la identificación a partir de un subcultivo de 4 h puede obtenerse en un tiempo similar con la ventaja de no necesitar un procesamiento previo de la muestra. En nuestra serie, solo en 9 (6%) de los 138 hemocultivos incluidos inicialmente en el estudio no se consiguió una identificación aceptable. En la serie de Hoyos-Mallecot et al.⁸ realizando identificación directa desde el hemocultivo, con un score de 1,7, el 4% de los BGN y el 26% de bacterias grampositivas no fueron identificados. Es posible que la muestra obtenida a partir de un subcultivo contenga mayor cantidad de proteínas que permiten obtener perfiles más fiables, aumentando la sensibilidad de la técnica.

Las estrategias que combinan la identificación con MALDI-TOF y la inoculación de paneles de CMI directamente del frasco de hemocultivo permiten acelerar el tiempo de emisión de informes, y en general han demostrado buenos resultados; sin embargo, la mayoría de los métodos publicados requieren un pretratamiento de la muestra. Machen et al.¹⁰, realizando un procesamiento previo de lisis-filtración, obtienen, con el sistema Vitek-2, una tasa global de error del 5,5%, con un 1,3% de errores máximos. Wimmer et al.¹¹, después de un primer paso de centrifugación de la muestra,

con el sistema Phoenix, encuentran una tasa de error próxima al 2%, con un 0,26% de errores máximos.

Trabajos previos han demostrado que la identificación obtenida con MALDI-TOF a partir del barrido de un subcultivo de muy pocas horas de incubación es concordante con la obtenida con la técnica de identificación recomendada a partir de subcultivos de 18-24 h^{11,12}. Idelevich et al.¹², en una serie de 104 aislados de hemocultivos, han evaluado la inoculación de paneles de CMI del sistema Vitek a partir del crecimiento en subcultivo de 2,5 a 7 h, y encuentran que el tiempo medio de incubación para CGP era de 3,8 h y para BGN, de 2,4 h. En base a estos resultados nosotros establecimos el tiempo de incubación en 4 h, y empleando por primera vez paneles de CMI del sistema WIDER conseguimos identificar el 93,5% de los aislados estudiados. Para los 119 aislados a los que se realizó CMI tras 4 h de incubación obtuvimos una concordancia con la técnica de referencia del 99,3%, sin observar errores máximos. Además, el método que evaluamos tiene la ventaja de no requerir ningún procesamiento previo de la muestra, por lo que no conlleva costes adicionales y puede adaptarse fácilmente al flujo de trabajo del laboratorio.

Entre las limitaciones de la técnica se encuentran las bacteriemias por anaerobios, en las que no se consigue crecimiento suficiente al cabo de 4 h de incubación, y las bacteriemias polimicrobianas. Otra limitación del estudio sería el bajo número de grampositivos incluidos en esta serie.

En conclusión, la inoculación de los paneles de CMI a partir de un subcultivo incubado durante 4 h, previa identificación con MALDI-TOF, es un método fiable comparado con el sistema convencional de inoculación tras 24 h de incubación y permite acortar el tiempo de informe de hemocultivos positivos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004;39:309–17.
- Baron EJ, Thomson RB. Specimen collection, transport and processing: Bacteriology, p 228–271. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC. 10th edition. tdition.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: Risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:760–6.
- Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures. *Am J Clin Pathol.* 2008;130:870–6.
- Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM. Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:369–71.
- Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:635–44.
- Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis.* 2013;57:237–45.
- Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ramírez MD, Navarro-Marí JM. Bacterial identification from blood cultures by a rapid Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight mass spectrometry technique. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:152–5.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:546–51.
- Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One.* 2014;9:e87870.
- Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative

- bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2452–4.
12. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Acceleration of antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by inoculation of Vitek 2 cards with briefly incubated solid medium cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52:4058–62.
 13. Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmée M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:405–13.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2015.
 15. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:2269–81.