

**Comparación del crecimiento y de la pérdida de viabilidad de *Streptococcus pneumoniae* en botellas FAN aeróbicas y BACTEC aeróbicas Plus**

**Sr. Editor:** El diagnóstico de bacteriemias es una de las prioridades en el laboratorio de microbiología clínica. La automatización de los hemocultivos mejoró considerablemente la recuperación de los microorganismos y disminuyó el tiempo de detección<sup>1-2</sup>. Sin embargo, algunas bacterias como *S. pneumoniae* pueden presentar procesos de autolisis con la posterior pérdida de viabilidad del microorganismo y occasionar subcultivos negativos a partir de botellas positivas<sup>3-5</sup>. Las botellas FAN aeróbicas del sistema BacT/ALERT fueron diseñadas para mejorar la recuperación de microorganismos y, entre otras cosas, para mantener la viabilidad de *S. pneumoniae*, en tanto que las botellas BACTEC aeróbicas Plus del sistema BACTEC cumplen el mismo objetivo por su composición con resinas adsorbentes y de intercambio<sup>6-7</sup>. La autolisis de *S. pneumoniae* se observó en ambos sistemas de detección cuando las botellas positivas permanecen en el incubador<sup>8</sup>. El objetivo de este trabajo fue comparar, mediante la realización de hemocultivos simulados, la capacidad de crecimiento de distintas cepas de *S. pneumoniae* en botellas FAN aeróbicas y BACTEC aeróbicas Plus y determinar la viabilidad bacteriana en diferentes tiempos una vez que los frascos se identificaron como positivos.

Se emplearon los sistemas automatizados BacT/ALERT 120 (bio Mérieux, Marcy l'Étoile, Francia) y BACTEC 9120 (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md, EE.UU.) con las botellas FAN aeróbicas plásticas y BACTEC aeróbicas Plus respectivamente. Los hemocultivos simulados se realizaron con 10 aislamientos no relacionados de *S. pneumoniae* recuperados de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de neumonía. Cada cepa fue inoculada en una botella FAN aeróbica plástica y una Bactec aeróbica Plus con una concentración final entre 10 y 100 UFC/ml. A cada botella se añadieron 8 ml de sangre humana. Las 20 botellas fueron incubadas en su respectivo sistema hasta que se obtuvo una señal de positividad, momento que fue definido como T0. Para hacer recuento de bacterias viables, las botellas se reincubaron a 35 °C hasta 48 h a partir de T0. Se realizaron subcultivos en Agar sangre a T0 y a las 7, 12, 24 y 48 h posteriores a T0. A fin de obtener el recuento de bacterias viables, se realizaron subcultivos de 0,25 ml y

de 0,025 ml del caldo original. Del mismo modo, se subcultivaron 0,25 ml y 0,025 ml de una dilución 1/10 y 1/100 del caldo original. De esta manera, el intervalo de detección fue de 4 UFC/ml a mayor igual  $8 \times 10^5$  UFC/ml (más de 200 colonias por placa en la última dilución). Las placas fueron incubadas hasta 72 h siguiendo el protocolo habitual del laboratorio.

Todas las botellas inoculadas fueron positivas dentro de las primeras 12 h de incubación. El tiempo de detección fue de 7,8 a 10,5 y 7,0 a 11,3 para los sistemas BacT/ALERT y Bactec, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de detección. La viabilidad de cada cepa en diferentes tiempos se observa en la tabla 1. Todos los aislamientos crecieron a las 7 h de detección de la positividad (T7) independientemente de la botella empleada. La viabilidad de *S. pneumoniae* disminuyó con rapidez en las botellas FAN aeróbicas respecto de las BACTEC aeróbicas Plus. Para T12, T24 y T48 se observó pérdida de viabilidad en el 30, 80 y 100% de las cepas inoculadas en las botellas FAN aeróbicas. No se detectó pérdida de viabilidad en las botellas BACTEC aeróbicas Plus. En los casos en que se obtuvo crecimiento en las botellas FAN aeróbicas, sus recuentos en T12 y T24 fueron siempre inferiores respecto de las botellas BACTEC aeróbicas Plus.

En muchos laboratorios de microbiología las botellas positivas detectadas por los sistemas automatizados durante la noche o fines de semana permanecen en el incubador. En algunos microorganismos como *S. pneumoniae* se pueden producir fenómenos de autolisis<sup>3-5</sup>. La demora en subcultivar botellas positivas puede provocar la pérdida de viabilidad del microorganismo dando falsos resultados de falta de crecimiento. En un trabajo previo encontramos hasta un 25% de pérdida de viabilidad asociado a tiempos de demora mayores a 7 h<sup>4</sup>. En este trabajo, utilizando hemocultivos simulados, evaluamos la capacidad de desarrollar y la viabilidad de *S. pneumoniae* en botellas FAN aeróbicas y BACTEC aeróbicas Plus a diferentes tiempos después de ser detectadas como positivas.

Todas las cepas inoculadas crecieron en menos de 12 h por lo que el sistema de hemocultivos simulados resulta comparable con los resultados obtenidos en pacientes y en ambos equipos automatizados en los que se observó para *S. pneumoniae* un media de detección de 11 y 11,5 h<sup>4,9</sup>. A las 7 h de detección de la positividad todas las cepas permanecen viables independientemente del tipo de botella. La via-

TABLA 1. Viabilidad de *Streptococcus pneumoniae* en diferentes tiempos tras la detección de positividad en dos tipos de botellas de hemocultivo

Cepa	Botella	Tiempo (h)				
		T0	T7	T12	T24	T48
1	FAN	>	>	$1,6 \times 10^3$	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
2	FAN	>	>	$4,8 \times 10^4$	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
3	FAN	>	>	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
4	FAN	>	>	NV	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
5	FAN	>	>	$3,6 \times 10^3$	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
6	FAN	>	>	NV	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
7	FAN	>	>	$6,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
8	FAN	>	>	$2,4 \times 10^4$	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
9	FAN	>	>	$1,6 \times 10^4$	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>
10	FAN	>	>	NV	NV	NV
	BACTEC	>	>	>	>	>

FAN: botellas FAN aeróbicas plásticas; BACTEC: botellas BACTEC aeróbicas Plus; T0: subcultivo realizado tras ser detectado como positivo; T7, T12, T24, T48: subcultivo realizado a las 7, 12, 24 y 48 h del tiempo T0, permaneciendo las botellas en el incubador a 35 °C; NV: no viable (< 4 UFC/ml); > : > 8 × 10<sup>5</sup>.

bilidad disminuye a T12, T24 y T48 en un 30, 80 y 100% de las cepas en las botellas FAN aeróbicas, respectivamente, mientras que todas las cepas son recuperadas en las botellas BACTEC. Cuando se obtuvo crecimiento en las botellas FAN aeróbicas, sus recuentos en T12 y T24 fueron siempre inferiores respecto de las botellas BACTEC aeróbicas Plus. Los resultados de pérdida de viabilidad en botellas FAN aeróbicas con hemocultivos simulados se correlacionan con los obtenidos en muestras de pacientes en los que observamos pérdida de viabilidad en aproximadamente el 20% de las botellas positivas que permanecieron más de 7 h en el incubador tras ser detectadas como positivas<sup>4</sup>. También resultan coincidentes con lo observado por otros autores en muestras de pacientes, ya que a las 48 h de la detección de la positividad, *S. pneumoniae* permanece viable en 6 de 21 botellas del sistema BacT/ALERT (28,6%) y en 20 de 23 (86,9%) botellas del sistema BACTEC<sup>8</sup>. En nuestro trabajo empleamos sólo botellas BACTEC aeróbicas Plus para el sistema BACTEC, mientras que Petti et al utilizan diferentes tipos de botellas. Si bien no lo comentan ellos, la autolisis observada en 3 cepas a las 48 h podría deberse a la utilización de otro tipo de botella o a un problema particular de cada cepa. Otros autores encuentran que *S. pneumoniae* permanece viable en botellas FAN aeróbicas por tiempos prolonga-

dos. Esta diferencia estaría relacionada a que no añaden sangre en las botellas, por lo que esta situación no reflejaría de manera real lo que ocurre en un hemocultivo<sup>6</sup>. Las botellas FAN aeróbicas y BACTEC aeróbicas Plus contienen un caldo de cultivo similar, por lo tanto las diferencias observadas podrían deberse a la capacidad del sistema *buffer* en mantener un pH adecuado para prevenir la liberación de las autolisinas y a la diferente eficiencia como agentes neutralizantes de toxinas de las resinas adsorbentes y de intercambio en comparación con el sistema Ecosorb® utilizado por las botellas FAN.

Muchos laboratorios de microbiología no poseen guardias u otros sistemas de atención continua durante la noche y los fines de semana. Por lo tanto, algunos episodios de bacteremia por *S. pneumoniae* no pueden ser diagnosticados correctamente por el sistema BacT/ALERT. La utilización de métodos de detección de antígenos en las botellas positivas con subcultivos negativos puede contribuir al diagnóstico, aunque no permiten el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos<sup>4,8,10,11</sup>. En conclusión, consideramos que *S. pneumoniae* permanece viable por más tiempo y con recuentos mayores en las botellas BACTEC aeróbicas Plus que en las botellas FAN aeróbicas. El medio de cultivo de las botellas FAN aeróbicas debería ser reformulado a fin de evitar la rápida autolisis de *S. pneumoniae*.

Hugo Edgardo Villar<sup>a,b</sup>,  
Mónica Beatriz Jugo<sup>a</sup>,  
Liliana María Longo<sup>b</sup>  
y Matías Visser<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bacteriología.  
Laboratorio Hidalgo. Buenos Aires.  
<sup>b</sup>Laboratorio de Bacteriología. Hospital  
General de Agudos Dr. Enrique Tornú.  
Buenos Aires. Argentina.

## Bibliografía

- Thorpe TE, Wilson ML, Turner JE, Di Giuseppe JL, Willert M, Mirret S, et al. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol*. 1990;28: 1608-12.
- Wilson ML, Weinstein MP, Reimer LG, Mirrett S, Reller LB. Controlled comparison of the BacT/ALERT and BACTEC 660/730 non-radiometric blood culture systems. *J Clin Microbiol*. 1992;30:323-9.
- Adeniyi-Jones CC, Stevens DL, Rasquinha ES. False no-growth blood cultures in pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol*. 1980;12: 572-5.
- Villar HE, Longo LM, Vicente A, Laurino G, Gutierrez M, Hoffman M. Autolysis of *Streptococcus pneumoniae* en hemocultivos. *Acta Biq Latinoam*. 2005;39:151-5.
- Fisher GW, Longfield R, Hemming VG, Valdes-Dapena A, Smith LP. Pneumococcal sepsis with false-negative blood cultures. *Am J Pathol*. 1982;78:348-50.
- Casetta A, Derouin V, Boussouant Y. Absence of spontaneous autolysis of *Streptococcus pneumoniae* in aerobic fan culture bottles in a commercial blood culture system. *J Clin Microbiol*. 1980;12:572-5.
- Applebaum PC. Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium. *J Clin Microbiol*. 1983;17:48-51.
- Petti CA, Woods CW, Barth Reller L. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2510-2.
- Neuman MI, Harper MB. Time to positivity of blood cultures for children with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1324-28.
- Browne K, Miegel J, Stottmeier KD. Detection of pneumococci in blood cultures by latex agglutination. *J Clin Microbiol*. 1994;19:649-50.
- Jesudason MV, Sridharan G, Arulselvan K, Joseph A, Steinhoff C, John TJ. C substance-specific latex agglutination for early and rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* in blood cultures. *Indian J Med Res*. 1995;102:258-60.