

# Evaluación del sistema Robobact en coprocultivos: un paso más hacia la automatización en el laboratorio de microbiología

Mercedes Alonso-Sanz<sup>a</sup> y Laura Molina<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Microbiología. C.E.P Carabanchel Área 11. Madrid. <sup>b</sup>Laboratorio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España.

**OBJETIVO.** Evaluación del sistema Robobact para el procesamiento de muestras de heces en comparación con el coprocultivo convencional.

**MÉTODO.** Se estudian 240 muestras procedentes de pacientes extrahospitalarios de Madrid, procesándolas simultáneamente con ambos métodos.

**RESULTADOS.** Globalmente se aislaron 13 cepas de *Campylobacter* spp., 12 de *Salmonella* spp., 4 de *Yersinia enterocolitica* y 1 de *Shigella* spp. Robobact no detectó una de las 13 cepas de *Campylobacter* y 2 de las 12 cepas de *Salmonella* spp. La única cepa de *Shigella* se detectó con Robobact. Los resultados obtenidos con Robobact estuvieron disponibles a las 24 h.

**CONCLUSIONES.** Robobact es una herramienta útil y rápida para el procesamiento microbiológico de heces.

**Palabras clave:** Coprocultivo. Enteropatógenos. Automatización.

**CONCLUSIONS.** Robobact is a fast, useful tool for microbiological processing of stool specimens.

**Key words:** Stool cultures. Enteropathogens. Automation.

## Introducción

El laboratorio de microbiología está viviendo actualmente un proceso de transformación en el cual la tecnología es un factor primordial. Por otro lado, a los profesionales del laboratorio se les demanda cada vez más una mayor eficiencia y una disminución en los tiempos de respuesta. No cabe duda que la adquisición de nuevas tecnologías y la automatización de numerosos procesos ha aportado grandes mejoras al laboratorio y esto es ya una realidad en las áreas de bioquímica y hematología. Sin embargo, en el campo de la microbiología, la automatización está mucho más limitada. Se han conseguido espectaculares avances en la automatización de ciertos aspectos microbiológicos como es el caso de la identificación bacteriana, la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana y también en el ámbito de la serología<sup>1,2</sup>, pero no ha sido así en el campo de la siembra bacteriológica. El procesamiento de las muestras de heces dentro del laboratorio de microbiología implica el uso de numerosos medios de cultivo selectivos, diferenciales y de enriquecimiento<sup>3,4</sup> que conlleva un gran trabajo manual y rutinario por parte del personal técnico de laboratorio. El sistema Robobact (Rotec Médica S.A.) reúne unas características que le hacen teóricamente adecuado para la automatización en el campo de la siembra bacteriológica y aporta la posibilidad de utilizar en el mismo dispositivo varios medios de cultivo diferenciales con el fin de aumentar la sensibilidad del diagnóstico microbiológico.

El objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento de este sistema en muestras de heces y compararlo con el coprocultivo convencional.

## Métodos

En el estudio se incluyeron 240 muestras de heces consecutivas procedentes de los centros de atención primaria y atención especializada extrahospitalaria del Área 11 de Madrid durante el primer trimestre de 2003 en las que se solicitaba coprocultivo para los enteropatógenos habituales. El procesamiento de muestras se realizó en paralelo con el protocolo de rutina habitual en este laboratorio y con la metodología del sistema Robobact (Rotec Médica S.A.).

Evaluation of the Robobact system for processing stool cultures: another step towards automation in the microbiology laboratory

**OBJECTIVE.** The objective of this study was to evaluate the Robobact system (DIESSE Diagnostica Senese S.p.A., Italy) for processing stool specimens and to compare it with conventional methodology.

**METHOD.** A total of 240 stool specimens from outpatients in Madrid (Spain) were studied. The samples were processed simultaneously with both the Robobact system and a conventional method.

**RESULTS.** Overall, 13 isolates of *Campylobacter* spp., 12 of *Salmonella* spp., 4 of *Yersinia enterocolitica* and 1 of *Shigella* spp. were obtained. The Robobact method failed to identify 1 of the 13 *Campylobacter* spp. isolates and 2 of the 12 *Salmonella* spp. isolates. The single *Shigella* spp. isolate was detected only by the Robobact system. All the Robobact results were available at 24 hours.

Correspondencia: Dra. M. Alonso-Sanz.  
Laboratorio de Microbiología. C.E.P Carabanchel Área 11.  
Aguacate, 13. 28044 Madrid. España.  
Correo electrónico: malonso.hdoc@salud.madrid.org

## Metodología habitual

El procesamiento manual se realizó siguiendo los procedimientos de referencia<sup>3,4</sup> y que brevemente consisten en: siembra de la muestra a su llegada en agar McConkey (37 °C), agar CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina-30 °C), agar campylosel (42° atmósfera microaerófila) y caldo de selenito (37 °C) como medio de enriquecimiento de *Salmonella* spp. A las 24 h de incubación se realiza la lectura de las placas de agar McConkey y de CIN y se siembra a partir del caldo de selenito una placa de agar Hektoen que se mantiene en incubación a 37 °C durante 24 h más. A las 24 h se realiza la lectura de la placa de Hektoen y de la placa de campylosel (ésta se ha mantenido en incubación 48 h). Todas las colonias aisladas se identificaron mediante metodología estandarizada.

## Metodología con Robobact

La muestra de heces se introduce en un tubo con el caldo de enriquecimiento adecuado (Coproset) según el enteropatógeno que se quiere buscar: Coproset *Salmonella-Shigella* con caldo de selenito, Coproset *Yersinia-Aeromonas* con caldo de peptona desoxicolato y Coproset *Campylobacter* con caldo Mueller-Hinton con 5% de sangre lada<sup>5</sup>. El personal técnico introduce cada Coproset en un dispositivo que lleva dos medios de cultivo y que se denomina Coprobact (Coproset *Salmonella-Shigella*, Coprobact *Yersinia-Aeromonas*, Coprobact *Campylobacter*) colocándolo dentro del instrumento Robobact. Este dispositivo se puede observar en la figura 1. Los medios de cultivo utilizados fueron agar SS (*Salmonella-Shigella*)/CHROMagar *Salmonella*® (CAS)<sup>6</sup>, agar *Salmonella-Shigella*/agar Hektoen, agar cefsulodina-irgasan-novobiocina/agar SS desoxicolato y medio Campylosel con agar sangre/agar CCDA (*blood-free charcoal cefoperazona deoxychocolate agar*)<sup>7</sup>. El instrumento Robobact realiza automáticamente las siguientes funciones: a) enriquecimiento de la muestra en el caldo mediante agitación magnética durante 6 h con el caldo de selenito y el caldo selectivo de *Campylobacter* y durante 2 h en el caldo de peptona desoxicolato; b) mantenimiento constante de la temperatura de incubación; c) después del período de enriquecimiento rompe el fondo del tubo mediante presión en el tapón, permitiendo que el caldo de cultivo entre en contacto con las asas de siembra. A continuación se realiza la siembra con asa calibrada de 1 µl sobre el medio de cultivo mediante un brazo robótico. En la figura 2 se pueden observar las características principales del instrumento Robobact con sus correspondientes módulos.

Se incubaron durante 22 h y al cabo de ese tiempo se realizó la lectura del crecimiento en todos los casos, incluyendo los medios de *Campylobacter*. En este último caso, si la lectura fue negativa, se incubaron otras 24 h más.

Todas las colonias aisladas se identificaron mediante metodología estandarizada.

## Resultados

Se aislaron globalmente enteropatógenos mediante ambos métodos en 30 muestras clínicas (12,5%) de las que 13 correspondían a *Campylobacter* spp. (5,4%), 12 a *Salmonella* spp. (5%), cuatro a *Yersinia enterocolitica* (1,6%) y uno a *Shigella* spp. (0,4%). Los aislados obtenidos por uno y otro método figuran en la tabla 1. Ambos métodos detectaron por igual 12 cepas de *Campylobacter* spp., y con el método habitual se obtuvo un aislado adicional que no fue detectado por Robobact. Robobact detectó 15 cepas sospechosas de *Campylobacter* spp., de las cuales tres no se confirmaron posteriormente. Todos los cultivos fueron positivos en la primera lectura y los que fueron negativos lo siguieron siendo incluso después de 24 h más de incubación.

En lo que se refiere a *Salmonella* spp. hubo concordancia entre ambos métodos en 10 muestras. Por el método

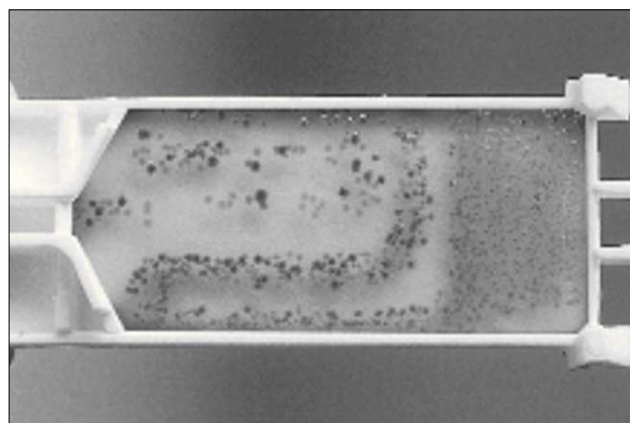


Figura 1. Dispositivo Coproset, con los medios de cultivo.



Figura 2. Aspecto del Instrumento Robobact.

TABLA 1. Aislados de los diferentes enteropatógenos obtenidos con la metodología convencional y con Robobact

	Método convencional	Robobact	Total
<i>Campylobacter</i> spp.	13	12	13
<i>Salmonella</i> spp.	12	10	12
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4	4	4
<i>Shigella</i> spp.	—	1	1
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>30</b>

Robobact se obtuvieron 12 aislados sospechosos, de los cuales dos no se confirmaron y hubo dos aislamientos que únicamente se detectaron por la técnica habitual. La sensibilidad de Robobact para la detección de *Salmonella* spp. fue del 83,3%.

En el caso de *Y. enterocolitica* hubo concordancia entre ambos métodos en los 4 casos detectados.

El único aislado de *Shigella* spp. se obtuvo mediante el sistema Robobact y no mediante la metodología habitual.

La sensibilidad del sistema Robobact fue de 90% con una especificidad del 100%. El valor predictivo negativo fue del 98%, siendo el valor predictivo positivo del 100%.

Todos los aislados del estudio fueron únicos; no se produjeron infecciones mixtas.

Todos los resultados de Robobact estuvieron disponibles a las 24 h. La reincubación de 24 h más en el caso de *Campylobacter* spp. hasta un total de 48 h no aportó ningún aislado adicional.

## Discusión

Se observa en primer lugar que la frecuencia global de los enteropatógenos estudiados así como el porcentaje de los diferentes microorganismos es similar a lo que se refleja en otros estudios en España<sup>8,9</sup> sin entrar en las características clínico-epidemiológicas de la población ni en la justificación o no de las peticiones, ya que éste no era el objetivo del estudio.

Es bien conocido que el aislamiento de bacterias enteropatógenas es incrementado con la utilización de diversos medios de cultivo con más o menos poder selectivo y diferencial. En el sistema Robobact se utilizan siete medios diferenciales y tres medios de enriquecimiento, mientras que en el coprocultivo convencional sólo se utilizan tres medios diferenciales y un caldo de enriquecimiento. Sin embargo, la sensibilidad para la detección de *Salmonella* spp. fue del 83,3% frente al 100% del método convencional. Probablemente en este estudio los medios diferenciales empleados en Robobact no fueron los adecuados. El medio CHROMagar *Salmonella* es altamente selectivo y cromogénico para el aislamiento de *Salmonella* spp. y tiene, según los estudios publicados, una gran sensibilidad, pero con la limitación de presentar falsos positivos<sup>6</sup>. El medio ha evolucionado desde su introducción en el mercado con diferentes formulaciones que han ido reduciendo progresivamente el número de resultados falsos positivos<sup>10</sup> y aunque la experiencia es aún limitada, los resultados son prometedores<sup>11</sup>. Está por ver que ésta sea la formulación definitiva, a la vista de los resultados que se vayan publicando sobre el mismo. En este estudio hubo dos resultados falsos positivos con Robobact que no se confirmaron con la metodología convencional y en los 2 casos la sospecha surgió a partir de colonias en el medio CHROMagar *Salmonella*, por lo que en nuestra experiencia, aunque limitada, la presencia de falsos positivos sigue siendo una limitación. En el caso de *Campylobacter* spp. hubo tres aislados sospechosos con Robobact que posteriormente no se confirmaron; en los 3 casos surgió la sospecha a partir del medio CCDA, medio al que este laboratorio no estaba habituado y que probablemente, al igual que con CHROMagar *Salmonella*, explica la discrepancia; esto lleva a una conclusión que, no por obvia, es menos importante, y es que el observador tiene que estar familiarizado y conocer muy bien los medios de cultivo con los que trabaja. Robobact aporta la automatización y la posibilidad de elegir los medios que el laboratorio considere adecuados.

El único aislado de *Shigella* spp. se obtuvo con Robobact, quizá porque el agar Hektoen utilizado como único medio diferencial en la metodología convencional resulta insuficiente para la detección de este microorganismo o bien porque el inóculo fuese muy bajo. El sistema Robobact, al disponer además de agar *Salmonella-Shigella* (dos medios diferenciales selectivos) hizo posible su detección, aunque al tratarse de un único aislado es imposible sacar conclusiones acerca de la sensibilidad de la técnica.

En áreas donde la frecuencia esperada de *Shigella* spp. fuese elevada podría ser aconsejable la implementación de una metodología como Robobact pero para saberlo con certeza harían falta más estudios con más muestras y con diferentes poblaciones.

No se ha considerado en este estudio el aislamiento de *Aeromonas* spp.; sin embargo, existen datos que avalan también a Robobact como herramienta útil para el cultivo de este microorganismo<sup>12</sup>.

El sistema Robobact es de fácil manejo para el personal técnico que sólo tiene que identificar la muestra, introducirla en los caldos de enriquecimiento adecuados y colocar los dispositivos Coprobact en el robot. Es un proceso rápido y limpio. La identificación puede hacerse manualmente o mediante un lector de código de barras.

En cuanto al tiempo que conlleva el procesamiento, con la metodología convencional se requiere un subcultivo del medio líquido de enriquecimiento el cual se realiza a las 18-24 h, según la rutina de trabajo establecida por el laboratorio, con lo que el proceso total dura como mínimo 48 h. La metodología de Robobact ha eliminado este paso gracias al enriquecimiento previo que realiza de la muestra antes de ser cultivada automáticamente en los medios diferenciales. Hay que resaltar que el crecimiento de *Campylobacter* spp. se obtuvo en todos los casos en 24 h y la reincubación prolongada no aportó ningún caso nuevo. Esto significa que en un período de 24 h se dispone del crecimiento de todos los enteropatógenos, que se identificarán posteriormente.

Al no utilizar los mismos medios de aislamiento en Robobact y en el coprocultivo convencional, no podemos establecer una comparación estricta entre ambos sistemas, aunque sí se pueden adelantar varias conclusiones.

El sistema Robobact es una herramienta útil y de fácil manejo en el procesamiento de coprocultivos. Si bien en los resultados globales de aislamiento de enteropatógenos no hay diferencias significativas entre los dos métodos, los resultados obtenidos en el caso de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. obliga a que el laboratorio se plantee cuidadosamente los medios a incluir en el dispositivo Coprobact y que lógicamente deben ser aquellos con los que el laboratorio esté más familiarizado.

Otras ventajas que aporta la automatización son la estandarización en el procesamiento de la muestra y la siembra constante de una misma cantidad haciendo la técnica mucho más objetiva.

## Bibliografía

1. Stanek L. Impact of technological development and organizational strategies on clinical laboratory cost reduction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 23:61-73.
2. Jenkins SG. Evaluation of new technology in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;23:53-60.
3. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias. Editor: Juan Picazo. *Procedimientos en Microbiología Clínica* núm. 7, 1994.
4. Gilligan P, Janda J, Karmali M, Miller M. Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. Cumitech 12A. Washington: ASM Press, 1992.
5. Hoffman PS, George HA, Krieg NR, Smibert RM. Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. jejuni II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. *Can J Microbiol* 1979;25:8-16.

6. Gailliot O, Di Camillo P, Berche P, Courcol R, Savage C. Comparison of CHROMagar Salmonella medium and Hektoen enteric agar for isolation of salmonellae from stool samples. *J Clin Microbiol* 1999;37:762-5.
7. Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces. *J Clin Microbiol* 1984;19:169-71.
8. Grande Benito A, Gayol Barba P, Redondo Alonso JC, González Hernández P. Infecciones gastrointestinales prevalentes en pediatría. *Bol Pediatr* 1998; 38:220-41.
9. Prats G, Llovet T, Muñoz C, Solé R, Mirelis B, Izquierdo C, et al. Etiología de la enteritis en un hospital general universitario de Barcelona (1992-1995). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:349-56.
10. Maddocks S, Olma T, Chen S. Comparison of CHROMagar Salmonella medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2999-3003.
11. Perez JM, Cavalli P, Roure C, Renac R, Gille Y, Freydiere AM. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1130-4.
12. Sánchez-Sánchez MA, De Rafael L, Baquero F, Cantón R. Evaluación del Sistema Robobact para el procesamiento automático de coprocultivos. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2003;21:463.