

USO DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU PARA LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN HEMOCULTIVOS

USE OF THE FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION TECHNIQUE FOR THE RAPID IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN BLOOD CULTURES

Maria L. Cómito⁽¹⁾, Mario Vilaró⁽¹⁾, Eduardo Cuestas⁽²⁾, Eduardo Moscone⁽³⁾.

Resumen

Antecedentes: La técnica de referencia para la detección de bacteriemias es el hemocultivo. Uno de los gérmenes que causa bacteriemias con mayor frecuencia es *Staphylococcus aureus* (SAU). La presencia de cocos Gram positivos en racimos (CGPR) en un hemocultivo es sugestiva de bacteriemia, aunque la relevancia del hallazgo depende de la identificación correcta del microorganismo. La tipificación definitiva demanda entre 24 y 48 hs. La técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH), es un método rápido para la identificación de bacterias en hemocultivos. **Objetivos:** El objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de FISH dirigido al ARN 16s de SAU, en muestras de hemocultivos con CGPR a la coloración de Gram, determinar la concordancia con el método de referencia y la factibilidad de implementarlo en la rutina del laboratorio de Microbiología. **Material y métodos:** Se incluyeron los hemocultivos estudiados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Privado de Córdoba, entre el 1/01/09 y 31/12/09. A cada hemocultivo positivo que mostró CGPR se les realizó simultáneamente identificación microbiológica bioquímica y FISH. **Resultados:** Sobre 496 positivas 32 mostraron CGPR y 24 se identificaron como SAU. Se observó una concordancia de 100% (IC95% 99 a 100) entre ambos métodos diagnósticos, con un valor de $\kappa < 0,01$. **Discusión:** La excelente concordancia obtenida abre la puerta a un estudio para determinar el valor predictivo de FISH, su sensibilidad y especificidad; y evaluar el impacto clínico de su incorporación a un laboratorio de bacteriología clínica.

Palabras Clave: hemocultivos, bacteriemia, *Staphylococcus*, identificación rápida, FISH.

Abstract

Background: The technique of reference for the detection of bacteriemia is the blood culture. One of the most frequent bacteria responsible of bacteriemia is *Staphylococcus aureus* (SAU). The presence of Gram positive cocci (CGPR), in blood culture give the suspicious of bacteriemia, although the relevance of the finding depends on the correct identification of the microorganism. The definitive typification it demands from 24 to 48 hours. The technique of fluorescent in situ hybridization (FISH), is a rapid method for the identification of bacteria in blood culture. **Aims:** The aims of this work was to establish the FISH technique directed to the 16S RNA of SAU in samples of blood cultures with CGPR to the Gram staining, to determine the concordance with the method of refer-

(1) Laboratorio de Microbiología, Hospital Privado Centro Médico de Córdoba;

(2) Área de Epidemiología Clínica y Bioestadística Hospital Privado Centro Médico de Córdoba, Av. Naciones Unidas 346. X5016KEH, email: lucrecom@hotmail.com;

(3) Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba

Realizado con el apoyo del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba.

Enviado: 06/10/2009

Aceptado: 18/11/2009

ence, and to evaluate the possibility to use as standard method in the laboratory of microbiology. Material and Methods: The blood cultures analyzed in the Laboratory of Microbiology of the Hospital Privado Cordoba from 01.01.2009 to 31.12.09 were included in this study. To each positive blood culture which showed CGPR was applied simultaneously biochemical identification and FISH. Results: From 496 positive samples, 32 showed CGPR, 24 of them were identified as SAU. A concordance of 100% (IC95% 99 to 100) between both methods of diagnosis, with a value of $k < 0.01$ was observed. Discussion: The excellent concordance opens the prospect for a study in order to determine the predictive value of FISH, its sensibility and specificity. Furthermore, it will be possible to evaluate its clinical impact being incorporated in a laboratory of clinical bacteriology.

Key words: blood cultures, bacteriemia, Staphylococcus, rapid identification, FISH

Introducción

La detección e identificación de microorganismos en la sangre de un paciente es uno de los diagnósticos más importantes del laboratorio de Microbiología Clínica (1). La bacteriemia se define como la presencia de bacterias viables en la sangre circulante. Una bacteriemia transitoria, o de bajo nivel, puede ocurrir luego de intervenciones dentales o de maniobras invasivas (2), no presenta signos clínicos, su evolución es benigna y generalmente tiene resolución espontánea. Sin embargo, cuando las bacterias se multiplican a una velocidad tal que excede la capacidad del sistema retículo endotelial de removerlas se produce la septicemia, que puede originar infecciones graves y generalizadas como el fallo multiorgánico séptico. La tasa de mortalidad de la septicemia en los pacientes oscila entre el 30 y el 70% y depende de varios factores, incluyendo agentes patógenos y los factores del huésped.

La técnica microbiológica de referencia para la detección de bacteriemias es el cultivo de sangre -hemocultivo- que permite recuperar las bacterias viables, identificarlas y realizar los ensayos de sensibilidad. Uno de los gérmenes que causa bacteriemias con mayor frecuencia es *Staphylococcus aureus* (SAU), ya que debido a la presencia de numerosos factores de virulencia presenta tasas de morbi-mortalidad elevadas (3,4,5). Se ha descrito un aumento en la inci-

dencia de bacteriemias por *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) aunque se comprobó que en la mayoría de los casos se trataba de contaminaciones y falsos positivos (6). La presencia de cocos Gram positivos dispuestos en racimos (CGPR) en una muestra de hemocultivo es sugestiva de bacteriemia, pero la relevancia del hallazgo depende de la identificación correcta del microorganismo y su evaluación dentro del contexto clínico de cada paciente. La tipificación definitiva requiere de subcultivos en medio sólido y pruebas bioquímicas que demandan un tiempo que oscila entre 24 y 48 hs (7). La identificación rápida de CGPR es de suma importancia por diferentes razones: (i) uso apropiado de los antibióticos evitando el tratamiento empírico de gérmenes contaminantes; (ii) menor presión de selección de microorganismos resistentes; (iii) mejora en el pronóstico de los pacientes con bacteriemia y (iv) disminución en los costos de internación. Ensayos inmunológicos, coagulasa en tubo y endonucleasa estable, métodos empleados para la identificación de *Staphylococcus aureus* a partir de sub-cultivos, han sido usados directamente sobre las botellas de hemocultivo que mostraron CGPR a la coloración de Gram, con resultados de sensibilidad y especificidad variables (8,9). En general todos los estudios se realizaron usando un solo tipo de medio de cultivo, sin apuntar a las posibles interferencias que se pueden producir usando diferentes medios

de cultivo, lo que explica la variabilidad en los resultados obtenidos. Técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la Hibridación Fluorescente in situ (FISH) han sido descritas para la identificación de SAU directamente sobre las botellas de hemocultivo positivas (10,11). Sin embargo, la realización PCR además de ser laboriosa y costosa requiere de una infraestructura compleja haciéndola poco viable su incorporación a la rutina del laboratorio clínico. El uso de FISH ha mostrado ser un método rápido, fidedigno y practicable para la identificación directa de bacterias que han desarrollado en hemocultivos (12). La técnica consiste en realizar una hibridación molecular con una sonda oligonucleotídica, marcada en su extremo con un fluorocromo, dirigida a una región específica y conservada del ARNr de SAU, produciendo una unión irreversible que se traduce en señales lumínicas cuando son observadas al microscopio de fluorescencia.

El objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de FISH dirigido al ARN 16s de SAU, en muestras de hemocultivos positivos que presenten CGPR a la coloración de Gram, determinar la concordancia con el método de referencia y establecer la factibilidad de implementarlo en la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica.

Material y Métodos

Se incluyeron todos los hemocultivos estudiados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba, en el período comprendido entre el 1° de enero y 31 de diciembre de 2009. Las muestras de sangre fueron incubadas durante un período de 5 días a una temperatura de 35°C bajo agitación constante en el sistema automatizado de detección de bacteriemias Bactec 9120 (Becton Dickinson, USA). A cada muestra positiva se le hizo coloración de Gram y aquellas que mostraron la presencia de CGPR se les realizó simultáneamente cultivo en

medio sólido sobre placas de agar sangre de carnero (Biomerieux) y FISH (13). La identificación de las colonias aisladas en medio sólido se hizo con el sistema de Identificación Automatizada VITEK 2 (Biomerieux, Francia). Para el control de calidad se usaron las cepas de referencia de la American Type Culture Collection (ATCC) 25923 y 29213 para SAU sensibles a la meticilina y la cepa ATCC 43300 para SAU resistentes a la meticilina. La técnica de FISH se llevó a cabo usando la sonda con la siguiente secuencia de nucleótidos: 5'- GAA GCA AGC TTC TCG TCC G -3' marcada con fluoresceína (Metabion, Alemania). Para la elección de la sonda se consultó la base de datos del Centro de Ecología Microbiana de la Universidad de Viena (probe-base). Brevemente: luego de haber fijado las muestras sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina al 0,01%, previo tratamiento enzimático con 1 mg/ml de lisozima (Sigma) durante 10 min. a 30°C, seguido por lisostafina (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml por 5 min a 30°C, se realizó la hibridación con buffer formamida adicionado con 50 ng/μl de sonda, durante 90 min. a una temperatura de 46°C. Posteriormente se lavaron con buffer de lavado durante 10 min. a 48°C. Los preparados fueron montados con medio Vectashield y se observaron al microscopio de epifluorescencia Leica DMLB, con filtro para fluoresceína bajo una excitación de 492 nm. Las imágenes se capturaron con una cámara Leica DC 250 y fueron procesadas con el programa de tratamiento de imágenes Leica IM 1000.

Se realizó un análisis estadístico para establecer la concordancia entre los métodos, estimándose ésta, en porcentajes con IC95%. La significación se calculó por medio de la prueba κ de Krombach. Se escogió un valor de $p < 0,01$.

Resultados

Sobre 7756 muestras de hemocultivos estudi-

adas, 496 fueron positivas (6,4% IC95% 5,8 a 7), de las cuales 32 mostraron CGPR a la coloración de Gram, siendo la identificación definitiva de los aislados: 24 SAU y 8 SCN. La técnica de FISH mostró resultados positivos en las 24 cepas de SAU y no se hallaron resultados positivos en las 8 cepas de SCN mostrando una excelente concordancia entre FISH y la identificación microbiológica de referencia. El control calidad con las cepas patrón ATCC de SAU no mostró resultados falsos (Figura 1).

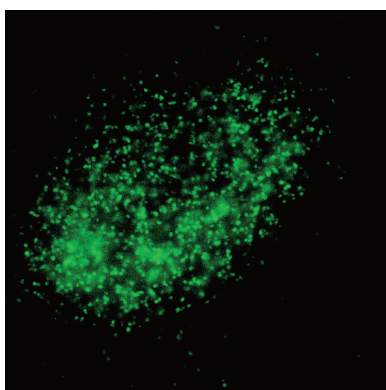


Figura 1: Señales fluorescentes obtenidas luego de la hibridación de la sonda oligonucleotídica sobre una muestra de hemocultivo que mostró CGPR a la coloración de Gram.

Para SAU se observó una concordancia de 100% 24/24 (IC95% 85,7 a 100) entre ambos métodos diagnósticos (Tabla 1), con un valor de κ de 1,0; p 0,001; en el caso de SCN la concordancia fue de 100% 8/8 (IC95% 63 a 100) (Tabla 2), con un valor de κ de 1,0; p 0,001.

Discusión

El desarrollo de métodos de diagnóstico microbiológico rápido es un desafío creciente. La necesidad de dar una respuesta concreta en el menor tiempo posible se ha transformado en el objetivo primordial en todo laboratorio de Microbiología moderno.

El uso de las técnicas moleculares que permiten

identificar microorganismo, sin pasar necesariamente por la etapa de cultivo, se ha presentado como una alternativa sensible y específica, en particular cuando la disminución del tiempo de

Muestra	SAUIM	SAUF
1	+	+
2	+	+
3	(-)	(-)
4	+	+
5	(-)	(-)
6	(-)	(-)
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	(-)	(-)
16	+	+
17	(-)	(-)
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	(-)	(-)
24	+	+
25	+	+
26	(-)	(-)
27	+	+
28	+	+
29	+	+
30	(-)	(-)
31	+	+
32	+	+

TABLA 1: Tabla de concordancia de los resultados obtenidos con identificación microbiológica y FISH para SAU. Referencias: SAUIM: Staphylococcus aureus identificación microbiológica, SAUF: Staphylococcus aureus identificación por FISH., +: resultado positivo, (-) resultado negativo.

detección condiona la implementación de un tratamiento adecuado. Esto último se verifica puntualmente en el caso de los pacientes con .

Muestra	SCNIM	SCNF
1	(-)	(-)
2	(-)	(-)
3	+	(-)
4	(-)	(-)
5	+	(-)
6	+	(-)
7	(-)	(-)
8	(-)	(-)
9	(-)	(-)
10	(-)	(-)
11	(-)	(-)
12	(-)	(-)
13	(-)	(-)
14	(-)	(-)
15	+	(-)
16	(-)	(-)
17	+	(-)
18	(-)	(-)
19	(-)	(-)
20	(-)	(-)
21	(-)	(-)
22	(-)	(-)
23	+	(-)
24	(-)	(-)
25	(-)	(-)
26	+	(-)
27	(-)	(-)
28	(-)	(-)
29	(-)	(-)
30	+	(-)
31	(-)	(-)
32	(-)	(-)

TABLA 2: Tabla de concordancia de los resultados obtenidos con identificación microbiológica y FISH para SCN. Referencias: SCNIM: Staphylococcus coagulasa negativa identificación microbiológica, SCNF: Staphylococcus coagulasa negativa identificación por FISH, +: resultado positivo, (-) resultado negativo.

bacteriemia en los que cualquier retraso en la antibioticoterapia puede tener consecuencias graves

El principal inconveniente que presentan los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos bacterianos es la elección de secuencia de nucleótidos adecuada para evitar las reacciones cruzadas con otros microorganismos afines, que pueden originar resultados falsos positivos. Para ello es necesario verificar la especificidad de la secuencia elegida comparándola con las cepas de referencia ATCC que confirman la presencia de resultados positivos verdaderos.

Los resultados obtenidos sobre la muestra estudiada mostraron una excelente concordancia entre la técnica de FISH y el método microbiológico de referencia. La ausencia de falsos positivos mostró una buena sensibilidad del método para ser implementado como diagnóstico. El tiempo de realización insume 3 horas, en relación a las 48 hs. que demanda la metodología tradicional, constituyendo un aporte significativo que influye directamente sobre el paciente optimizando la calidad de su tratamiento con las previsibles mejoras clínicas consecuentes, en especial en pacientes sépticos en estado crítico. Una ventaja adicional de FISH sobre el resto de los métodos moleculares existentes, es la prescindencia de requerimientos tecnológicos complejos volviendo la técnica accesible a la mayoría de los laboratorios de bacteriología clínica y la facilidad de incorporarlo a la rutina diaria de trabajo sin agregar complicaciones ya que su realización es sencilla y práctica. El principal inconveniente de la observación al microscopio de fluorescencia es la necesidad de personal entrenado en la misma. Con frecuencia la interpretación de las imágenes suele ser subjetiva originando resultados confusos. La lectura de FISH contra CGPR mostró señales de

excelente intensidad y no se constató la presencia de ruido de fondo o hibridaciones no específicas que pueden generar lecturas erróneas. Esto constituye una ventaja adicional debido a que el procedimiento puede ser llevado a cabo con rapidez por cualquier persona habituada a la observación de preparaciones microscópicas fluorescentes eliminando la subjetividad del observador.

En conclusión la técnica de FISH, para identificar SAU en hemocultivos positivos con CGPR a la coloración de Gram, se mostró como una herramienta rápida y eficaz que permite acortar el tiempo de emisión de resultados de laboratorio. Este es el primer trabajo de este tipo en Hispano América y abre la puerta a un estudio con mayor número muestral con el objeto de determinar en el futuro el valor predictivo de FISH, su sensibilidad y especificidad; y evaluar el impacto clínico de su incorporación a un laboratorio de bacteriología clínica.

Referencias

1. Baron, E J. Processing and Interpretation of Blood Cultures. In Isenberg H. D. (ed.). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 1998. p. 58-62.
2. Pezzlo, M. Interpretation of Aerobic Bacterial Growth on Primary Culture Media. In Isenberg, H.D. (ed.). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 1998. p. 51-57.
3. Sheagren, J. N.. Staphylococcus aureus. The persistent pathogen (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 1984. 310:1368–1373
4. Sheagren, J. N. Staphylococcus aureus. The persistent pathogen (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 1984. 310:1437–1442.
5. Wischnewski, N., G. Kampf, P. Gastmeier, J. Schlingmann, F. Daschner, M. Schumacher, and H. Ruden. Prevalence of primary bloodstream infections in representative German hospitals and their association with central and peripheral vascular catheters. *Zentbl. Bakteriol.* 1998. 287:93–103.
6. Gastmeier, P., C. Geffers, D. Sohr, F. Schwab, M. Behnke, and H. Ruden. Surveillance of nosocomial infections in intensive care units. Current data and interpretations. *Wien Klin. Wochenschr.* 2003, 115:99–103.
7. Qian, Q, Eichelberger, K and Kirby, J E . Rapid Identification of Staphylococcus aureus in Blood Cultures by Use of the Direct Tube Coagulase Test. *Journal of Clinical Microbiology*; 2007, 45: 2267-2269.
8. Oliveira K, Brecher S M, et. Al. Direct Identification of Staphylococcus aureus from Positive Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41, (2): 889–891.
9. Qian Q, Eichelberger K, Kirby J E, et. Al. Rapid Identification of Staphylococcus aureus in Blood Cultures by Use of the Direct Tube Coagulase Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45, (7) : 2267–2269.
10. Oliveira, K, Procop, W G, Wilson, D, Coull, J and Stender, H. Rapid Identification of Staphylococcus aureus directly from Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. *Journal of Clinical Microbiology*; 2002, 40: 247-251.
11. Brakstad, O G , Maeland J A. Direct identification of Staphylococcus aureus in blood cultures by detection of the gene encoding the thermostable nuclease or the gene product. *APMIS*, 1995; 103:209–218.
12. Kempf, V A J, Trebesius, K, and Autenrieth, I B .Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*; 2000, 38:830-838.
13. Daims H, Stoecker K, Wagner M. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. *Advanced Methods in Molec. Ecology*. 2005; P. 213-239