

# Autólisis de *Streptococcus pneumoniae* en hemocultivos

► Hugo Edgardo Villar<sup>1\*</sup>,<sup>\*\*</sup>, Liliana María Longo<sup>1\*</sup>, Gustavo Jorge Laurino<sup>2\*</sup>, Adriana Vicente<sup>1\*</sup>, Marisa Estela Gutiérrez<sup>3\*</sup>, Marta Hoffman<sup>3\*</sup>

- 
1. Bioquímico.
  2. Técnico de laboratorio.
  3. Médico.

\* Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú. Combatiente de Malvinas 3002. (1427) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

\*\* Laboratorio Hidalgo. Ladislao Martínez 43. (1640) Buenos Aires. Argentina.

## Resumen

El proceso de autólisis de *Streptococcus pneumoniae* en medios líquidos puede ocasionar problemas en muestras de hemocultivos impidiendo su recuperación y, por lo tanto, el diagnóstico microbiológico, así como el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue revisar la frecuencia de este fenómeno en muestras clínicas y determinar las mejores condiciones de detección para este germen en los sistemas automatizados. Fueron incluidos todos los pacientes con diagnóstico de neumonía y hemocultivos positivos por *S. pneumoniae* y pacientes con diagnóstico de neumonía, botellas positivas y subcultivos negativos. Se evaluó el tipo de botella empleada, tiempo de detección, tiempo de demora en subcultivar las botellas y recuperación del germen. El procesamiento de las botellas, identificación del microorganismo y el estudio de sensibilidad a los antibióticos se realizaron según el protocolo habitual del laboratorio. Se evaluaron 110 botellas distribuidas de la siguiente manera: 104 FAN aerobias y 6 FAN anaerobias pertenecientes a 51 pacientes. Se obtuvo señal de positividad en 96 FAN aerobias (92,3%) y en 2 FAN anaerobias (33,3%). Todas las botellas positivas fueron detectadas en las primeras 26 h de incubación con una media de 11 h. En 38 de 51 pacientes (74,5%) se recuperó *S. pneumoniae* en los subcultivos, mientras que en 13 (25,5%) no se obtuvo desarrollo. La pérdida de viabilidad en estos casos se correlacionó con la demora en subcultivar las botellas positivas. La recuperación del germen fue del 100, 78,9 y 25% cuando la demora en subcultivar fue < 7 h, 7 a 14 h y > 14 h respectivamente. Se concluye que la utilización de botellas FAN aerobias permitió una adecuada recuperación de *S. pneumoniae*. Aquellos laboratorios que no poseen un servicio de guardia de Bacteriología podrían perder un porcentaje significativo de aislamientos de *S. pneumoniae* debido a fenómenos de autólisis. A fin de evitar este problema se recomienda implementar un sistema de vigilancia cada 7 h con descarga y subcultivo de botellas positivas.

**Palabras clave:** *Streptococcus pneumoniae* \* autólisis \* hemocultivos \* BacT/Alert

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

## Summary

### AUTOLYSIS OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN BLOOD CULTURES

*Spontaneous autolysis of Streptococcus pneumoniae in blood cultures causes a serious problem. Clinically relevant microorganisms are not detected and antimicrobial susceptibility testing cannot be performed. The aim of this study was to review the frequency of spontaneous autolysis in blood cultures and to analyze the detection and isolation of S. pneumoniae from blood cultures. Patients with clinically diagnosed pneumonia and positive blood cultures were included. Another group of patients with pneumonia, positive blood culture but negative subcultures was also included. Type of bottle, time of detection and recovery of S. pneumoniae in subcultures were recorded. All bottles were processed according to the manufacturer's instructions. A total of 110 bottles from 51 patients were evaluated. Out of 104 FAN aerobic bottles, 96 (92.3%) were positive. Out of 6 FAN anaerobic bottles only 2 (33.3%) were positive. Mean time detection was 11 hours and all positive bottles were detected after 26 hours of incubation. S. pneumoniae was recovered in subcultures in 38 of 51 patients (74.5%). Loss of viability associated to autolysis was detected in 13 patients (25.5%). Loss of viability was related to delay in removal of positive bottles from incubator. The recovery of microorganisms was 100, 78.9 and 25% when the time of delay was < 7 h, 7-14 h and > 14 h respectively. Detection of S. pneumoniae was more frequent in FAN aerobic bottles. Isolates clinically significant of S. pneumoniae cannot be recovered if positive bottles remain inside incubator more than 7 hs. Microbiology laboratories should have personnel to remove positive bottles during the night and at weekends.*

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae* \* autolysis \* blood cultures \* BacT/Alert

## Introducción

La detección de bacteriemias es una de las tareas más importantes en el laboratorio de Bacteriología. La automatización de hemocultivos representa un gran avance respecto del sistema manual especialmente por la mayor recuperación y el menor tiempo de detección de microorganismos patógenos (1) (2).

Como en toda determinación de laboratorio las causas de falsos negativos y positivos han sido estudiadas. Diferentes publicaciones mostraron que empleando subcultivos terminales no se lograba una recuperación significativa de microorganismos (3) (4). Sin embargo, otros autores mostraron que *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida spp* no eran detectadas si las botellas se incubaban previamente a 36 °C, dando entonces resultados falsos negativos (5) (6).

La frecuencia de falsos positivos es menor al 1,5% y puede deberse, entre otros factores, a muestras con elevado número de leucocitos o al llenado de botellas con un volumen mayor al recomendado (7).

Una situación particular ocurre con *Streptococcus pneumoniae*, ya que a veces se produce la lisis del microorganismo en el incubador, hecho que no permite su recuperación en los subcultivos (8).

El objetivo de este trabajo fue analizar la recuperación de *S. pneumoniae* utilizando un sistema automatizado de hemocultivos considerando el tiempo de detección de los episodios de bacteriemia y la frecuencia

de casos de pérdida de viabilidad atribuibles a fenómenos de autólisis.

## Materiales y Métodos

**Sistema automatizado:** todas las muestras de sangre fueron procesadas en el sistema de monitoreo continuo BacT/Alert 120 (Bio-Mérieux, l'Etoile, Francia).

**Botellas:** se emplearon botellas FAN aerobias y anaerobias. En este hospital el esquema de toma de muestra consiste en 2 tomas que se colocan en general en botellas FAN aerobias.

**Pacientes:** todos los pacientes ingresados en el estudio fueron adultos que concurrieron al Hospital General de Agudos Dr. Enrique Tornú durante el período febrero de 2001 a diciembre de 2003. Fueron agrupados de la siguiente manera:

Grupo 1: Pacientes con diagnóstico clínico de neumonía, botellas con señal de positividad y subcultivo con desarrollo de *S. pneumoniae*.

Grupo 2: Pacientes con diagnóstico clínico de neumonía, botellas con señal de positividad y subcultivo negativo.

**Tiempos:** los valores de tiempo de detección y de descarga de las botellas positivas fueron obtenidos de la información suministrada por el sistema en la pantalla de edición de botellas.

Se definió al tiempo de demora en subcultivar (TDS) como la diferencia entre el tiempo de descarga y el tiempo de detección. Si un paciente tuvo más de una botella positiva, se consideró el menor tiempo de detección y el menor valor de TDS.

**Cultivo, identificación y pruebas de sensibilidad:** todas las botellas con señal de positividad fueron subcultivadas en agar chocolate con atmósfera de 5-10% CO<sub>2</sub>. En algunos casos una alícuota fue sembrada en caldo BHI o caldo tioglicolato con vaselina. Las placas y caldos fueron incubados 3 y 7 días, respectivamente.

La identificación del aislamiento se realizó según la metodología convencional (9) y las pruebas de sensibilidad según las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (ex NCCLS) (10).

**Detección de antígenos bacterianos:** se realizó empleando el reactivo BD Directigen, Meningitis Combo *Test*. Un volumen de 5 mL de cada botella positiva con subcultivo negativo fue centrifugado durante 10 min y una alícuota del sobrenadante fue enfrentada con el reactivo de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

## Resultados

Se evaluaron 110 botellas distribuidas en 104 FAN aerobias y 6 FAN anaerobias, pertenecientes a 51 pacientes. Se obtuvo señal de positividad en 96 botellas FAN aerobias (92,3%) y en 2 FAN anaerobias (33,3%).

En la Tabla I se muestra el porcentaje acumulativo de pacientes en función del tiempo de detección. Todas las botellas fueron caracterizadas como positivas en las primeras 26 h de incubación, con un intervalo de 2 a 25,2 h. La mitad de los casos se detectaron dentro de las 11 h de incubación.

En 38 pacientes (74,5%) el subcultivo fue positivo con desarrollo de *S. pneumoniae* (Grupo 1). No se detectó resistencia a penicilina aunque, 2 (5,3%) de 38 aislamientos tuvieron sensibilidad intermedia con una CMI de 0,25 y 0,5 mg/L.

En 13 pacientes (25,5%) que tuvieron botellas con señal de positividad no se obtuvo desarrollo en los subcultivos (Grupo 2). Sin embargo, la gráfica de crecimiento mostró un incremento mayor a 2.000 unidades de reflectancia en un intervalo de 2 a 5 h. Estas curvas de crecimiento son atribuibles a desarrollo bacteriano y no a falsos positivos. En la coloración de Gram se observaron cocobacilos negativos en 4 casos y ausencia de gérmenes en los 9 restantes. Las siembras en caldo BHI o en tioglicolato no modificaron los resultados de la siembra normal. En estos pacientes el diagnóstico clínico fue neumonía y en 7 de ellos se recuperó *Streptococcus pneumoniae* en el cultivo de esputo. Las botellas positivas de estos 13 pacientes fueron positivas para antígeno de *S. pneumoniae* y negativas para *H. influenzae*.

En la Tabla II se muestra la recuperación de *S. pneumoniae* en los subcultivos para botellas con diferentes valores de TDS.

La viabilidad de *S. pneumoniae* fue del 100% cuando las botellas se subcultivaron en las primeras 7 h desde la señal de positividad (TDS < 7 h). La recuperación del germen disminuyó a medida que las botellas positivas permanecieron más tiempo en el incubador. De esta manera, para TDS entre 7 y 14 h el rendimiento fue del 78,9% y para TDS > 14 h fue del 25%. La recuperación total fue del 74,5%.

## Discusión y Conclusiones

*S. pneumoniae* es el principal agente etiológico causante de neumonía bacteriana de la comunidad. En general 20 a 30% de estas neumonías presentan bacteriemia y el hemocultivo es en algunos casos la única muestra disponible para realizar un diagnóstico microbiológico. En este trabajo se analizaron las condiciones de detección y recuperación de este germen en un sistema automatizado. Todos los episodios de bacteriemia fueron detectados en las primeras 26 h con una media de 11 h de incubación. Estos resultados obtenidos en pacientes adultos resultan similares a los obte-

Tabla I. Porcentaje acumulativo de pacientes con botellas positivas en función del tiempo de detección.

Pacientes (n)	Tiempo de detección (h)												
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26
Grupo 1 (38)	5,3	18,4	18,4	26,3	36,8	55,3	78,9	86,8	94,7	94,7	97,4	97,4	100
Grupo 2 (13)	0	15,3	15,3	53,8	84,6	84,6	100						
Total (51)	3,9	17,6	17,6	33,3	49,0	70,6	84,3	90,2	96,1	96,1	98,0	98,0	100

Grupo 1: Pacientes con diagnóstico de neumonía, botellas positivas y subcultivo con desarrollo de *Streptococcus pneumoniae*.  
Grupo 2: Pacientes con diagnóstico de neumonía, botellas positivas y subcultivo negativo.

Tabla II. Recuperación de *Streptococcus pneumoniae* en los subcultivos en función del tiempo de demora en subcultivar (TDS).

	Tiempo de demora en subcultivar			Total
	< 7 h	7-14 h	> 14 h	
Número de casos	20	19	12	51
Subcultivos positivos	20 (100%)	15 (78,9%)	3 (25,0%)	38 (75,5%)

nidos en pacientes pediátricos, en el sistema Bactec 9240, donde la media de detección fue de 11,5 h con un intervalo de 4,4 a 25,9 h (11).

El número de botellas FAN anaerobias es escaso por lo que no permite una comparación en relación a las botellas FAN aerobias. De todas maneras la detección de *S. pneumoniae* fue del 92,3% en las aerobias y del 33,3% en las anaerobias.

Es conocido que en medios líquidos se puede producir autólisis de *S. pneumoniae*.

En el caso particular de hemocultivos puede ocasionar la pérdida de viabilidad en el incubador (8). Para evitar este problema, el fabricante diseñó botellas FAN con caldo BHI y pH 8 suplementado con Ecosorb, compuesto en parte por carbón activado y Tierra de Fuller. Estas botellas permitieron la viabilidad del *S. pneumoniae* por tiempos prolongados (12). Sin embargo en este trabajo se encontró autólisis en 13 casos (25,5%). Estos pacientes tuvieron diagnóstico de neumonía, señal de positividad en hemocultivos con subcultivos negativos y gráfica de crecimiento consistente con desarrollo bacteriano. En 7 de ellos se aisló *S. pneumoniae* en el esputo. La observación de cocobacilos gram negativos podría deberse a la alteración de microorganismo por el proceso de lisis (8). La falta de recuperación del germen fue asociada a la demora de más de 7 h en descargar las botellas positivas. Esto ocurrió generalmente durante los días sábados y domingos ya que el laboratorio de bacteriología no cuenta con personal de guardia. El informe del laboratorio en estos casos fue: "hemocultivo positivo con germen no viable, compatible con autólisis de *S. pneumoniae*". La discrepancia entre el comportamiento *in vitro* (12) y las muestras clínicas podría deberse a la sangre humana. En un medio líquido *S. pneumoniae* libera hemolisinas y produce la lisis de los glóbulos rojos tomando el medio de cultivo un aspecto chocolateado. Esta situación sumada al desarrollo bacteriano podría provocar un descenso del pH, que no puede ser compensado por el sistema *buffer* del medio, ocasionando la activación de las autolisinas del *S. pneumoniae* con la posterior lisis del germen.

En forma ideal las muestras de hemocultivos deben ingresarse en el incubador dentro de las 2 h de obte-

nidas y luego de ser detectadas como positivas deben ser removidas y subcultivadas sin demoras.

El efecto en la demora en el ingreso de botellas no se estudió en este trabajo. A pesar de esto, si se considera que el tiempo de detección de este germen es rápido (media de 11 h), no sería recomendable preincubar botellas a 36 °C para luego introducir las en el sistema automatizado. Las botellas preincubadas podrían permitir el desarrollo y el comienzo de la lisis del germen y al ser colocadas en el incubador podrían no ser detectadas por el sistema al estar el germen en un proceso de autólisis.

En conclusión, para una mejor detección y recuperación de *S. pneumoniae* se recomienda la utilización de botellas FAN aerobias. Si las muestras no son ingresadas al incubador deberían permanecer a temperatura ambiente. Si son, preincubadas previamente debería realizarse un subcultivo antes de ingresarlas, al menos en aquellas provenientes de pacientes con diagnóstico de neumonía. A fin de asegurar la recuperación de *S. pneumoniae*, cada laboratorio debería implementar un sistema de vigilancia cada 7 h con descarga y subcultivo de botellas positivas.

#### CORRESPONDENCIA

DR. HUGO E. VILLAR  
Laboratorio Hidalgo. Ladislao Martínez 43  
1640 MARTÍNEZ - Buenos Aires - Argentina  
E-mail: bacteriologia@lhidalgo.com.ar

#### Referencias bibliográficas

1. 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.
2. Wilson ML, Weinstein MP, Reimer LG, Mirrett S, Reller LB. Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 323-9.
3. Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and

- lack of need for routine subculture of 5- to 7- day negative cultures. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2743-5.
4. Shigei JT, Shimabukuro JA, Pezzlo MT, de la Maza LM, Peterson EM. Value of terminal subcultures for blood cultures monitored by BACTEC 9240. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1385-8.
  5. Ziegler RI, Johnscher P, Martus D, Lenhardt, Just H-M. Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 657-61.
  6. Klaerner HG, Eschenbach U, Kamereck K, Lehn N, Wagner H, Miethke T. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2000 Mar; 38 (3): 1036-41.
  7. Weinstein MP, Mirrett S, Wilson ML, Reimer LG, Reller LB. Controlled evaluation of 5 versus 10 milliliters of blood cultured in aerobic BacT/Alert blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2103-6.
  8. Adeniyi-Jones CC, Stevens DL, Rasquinha ES. False no-growth blood cultures in pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1980; 12 (4): 572-5.
  9. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isemberg HD, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: American Society of Microbiology; 1991.
  10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova Pa; 2004.
  11. Neuman MI, Harper MB. Time to positivity of blood cultures for children with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (8): 1324-8.
  12. Casetta A, Derouin V, Boussougant Y. Absence of spontaneous autolysis of *Streptococcus pneumoniae* in aerobic fan culture bottles in a commercial blood culture system. *J Clin Microbiol* 1980; 12 (4): 572-5.

Aceptado para su publicación el 29 de abril de 2005