

Identificación rápida de *Staphylococcus aureus* en hemocultivos por medio de la prueba directa de la coagulasa*

Mónica Cecilia Cuartas¹, Olga Lucía Molina¹, Ana Cristina Restrepo¹, Gloria Patricia Marín¹, Jorge Hernando Donado², John Jairo Zuleta³, Jaime Alberto López⁴

Resumen

La diferenciación rápida del tipo de estafilococo hallado en los hemocultivos permite establecer tempranamente un tratamiento apropiado y evita el inicio de antibióticos de tipo glicopéptido.

Objetivo: determinar el rendimiento de la prueba de la coagulasa, hecha directamente con el contenido de los viales de hemocultivos, en los cuales se detectaba crecimiento de cocos grampositivos compatibles con estafilococos.

Métodos: en caso de observar en el vial de hemocultivo solo cocos grampositivos compatibles con estafilococos, se procedía a hacer la prueba directa de la coagulasa, interpretándola cuatro horas después. Se hacían subcultivo e identificación de la bacteria y se comparaba el resultado con el de la prueba directa.

Resultados: se hicieron 1.518 pruebas de coagulasa directa de las que 411 (27,1%) fueron positivas y 1.107 (72,9%), negativas. Se cultivaron 446 cepas de *S. aureus* de las que 410 tuvieron la prueba de coagulasa directa positiva, para una sensibilidad del 91,9%. Sólo en un vial de los 411 con la prueba positiva se aisló un *Staphylococcus spp.*, coagulasa negativa, lo cual determinó una especificidad del 99,8%. El valor predictivo positivo fue 99,7% y el negativo, 96,7%.

Conclusiones: los resultados confirman la utilidad de la prueba de la coagulasa directa en los viales de hemocultivos para diferenciar oportunamente el tipo de estafilococo cultivado. Se puede emplear como una prueba presuntiva para decidir el inicio o no del tratamiento empírico del paciente infectado por cocos grampositivos, al obtener el reporte preliminar de los hemocultivos.

Palabras clave

Coagulasa negativa, Hemocultivos, Prueba de la coagulasa directa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus spp

¹ Bacterióloga, Hospital Pablo Tobón Uribe

² Jefe de la Unidad de Investigación y Docencia, Hospital Pablo Tobón Uribe

³ Médico epidemiólogo, Hospital Pablo Tobón Uribe

⁴ Coordinador del Laboratorio Microbiología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

Autor responsable de la correspondencia: Jaime Alberto López V. Calle 78B No. 69-240, Medellín, Colombia. Teléfono (574) 4459286. Fax (574) 4417955. Dirección electrónica: jlopez@hptu.org.co.

* Un informe preliminar de este trabajo se presentó en el V Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Armenia, Quindío, Colombia. 8-11 de junio de 2006. Resumen C5).

Recibido: junio 17 de 2008

Aceptado: septiembre 10 de 2008

Summary

Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by means of the direct tube coagulase test

Rapid differentiation of *Staphylococcus spp.* strains grown in blood cultures is the basis for early and appropriate treatment of *S. aureus* infections.

Objective: To evaluate the usefulness of the direct tube coagulase test done from blood culture vials with presumptive growth of *Staphylococci*.

Methods: Direct tube coagulase test was carried out if only clusters of gram-positive cocci were observed in the blood culture vials; interpretation was done four hours later and results were later compared with those obtained with colonies from subcultures.

Results: 1.518 direct tube coagulase tests were carried out; of them, 411 (27.1%) were positive and 1.107 (72.9%), negative. Out of the 446 strains of *S. aureus* that were isolated, 410 had positive direct tube coagulase test (sensitivity 91.9%). An additional strain of *S. aureus* was positive in the direct test but negative in the subculture (specificity 99.9%). Predictive values were 99.7% (positive) and 96.7% (negative).

Conclusions: Our results confirm the usefulness of the direct tube coagulase test done from blood cultures to opportunely differentiate staphylococci grown in blood cultures. Information so obtained may be used to decide the beginning of empirical treatment.

Key words

Blood cultures, Coagulase negative, Direct tube coagulase test, Staphylococcus aureus, Staphylococcus spp

INTRODUCCIÓN

Los hemocultivos son una ayuda diagnóstica importante para identificar los microorganismos responsables de enfermedades como la endocarditis, sepsis, neumonía, osteomielitis y pielonefritis.¹ Sin embargo, los microorganismos que crecen en los hemocultivos se asocian a infección clínica solo en el 60 a 80% de los casos.¹

³ Los resultados falsos positivos los causa, en la mayoría de los casos, la contaminación con la flora que coloniza la piel del paciente, introducida accidentalmente en el

momento de obtener la muestra para el hemocultivo.⁴ El mayor porcentaje de los microorganismos contaminantes corresponde a estafilococos coagulasa negativa (ECN), que son causa de infecciones en pacientes con válvulas cardíacas protésicas, derivaciones del líquido cefalorraquídeo, catéteres de diálisis peritoneal y líneas intravasculares.⁵ Se calcula que un 85% de los aislamientos de ECN en los hemocultivos son contaminantes.⁶ La contaminación de los hemocultivos puede conducir a una terapia antibiótica innecesaria, a hacer exámenes de laboratorio y procedimientos diagnósticos adicionales y a días extras de hospitalización, lo que incrementa los costos de la atención en salud.⁷⁻¹⁰ En el caso de los hemocultivos con cocos grampositivos en acúmulos existe la posibilidad de la presencia de *Staphylococcus aureus*. Al contrario de los ECN, el *S. aureus* es un agente etiológico responsable de infecciones más virulentas, por lo que resulta de vital importancia establecer con la mayor prontitud la diferencia entre estos dos grupos de microorganismos, ya que se ha demostrado que el tratamiento adecuado y oportuno de la bacteriemia por *S. aureus* mejora su pronóstico.^{11,12} El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de la prueba de la coagulasa hecha directamente en las muestras de hemocultivos con crecimiento de cocos grampositivos en acúmulos, para diferenciar entre *S. aureus* y ECN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Estudio observacional de corte transversal.

Población

Entre abril de 1999 y junio de 2007 se hicieron 1.518 pruebas de coagulasa directa (PCD) en los viales de hemocultivos con crecimiento de cocos grampositivos en acúmulos, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Pablo Tobón Uribe, institución universitaria de cuarto nivel de atención, localizada en el área urbana de Medellín, Colombia, con un total de 274 camas. La información se obtuvo partir de la base de datos del Laboratorio de Microbiología del Hospital, en la cual se registraron, entre otras variables, el resultado de la coloración de Gram hecha en los hemocultivos positivos, el de la prueba de la coagulasa realizada directamente a partir de los viales y el microorganismo identificado en los hemocultivos

positivos. Para la recolección de los datos se empleó el programa Epi Info 6.04.

Técnicas de laboratorio

Los hemocultivos se recolectaron y procesaron empleando el sistema Bactec (Becton Dickinson). Cuando este detectaba un hemocultivo como positivo se procedía a hacer la coloración de Gram con una muestra obtenida del vial. En caso de observar cocos grampositivos en acúmulos, compatibles con *Staphylococcus spp.*, se procedía a realizar la PCD con una porción del contenido del vial. Para ello se extraía 0,1 mL del vial que se agregaba a un tubo con 0,5 mL de plasma humano. La mezcla se incubaba a 35 °C por 4 horas. Transcurrido este lapso se interpretaba la prueba como positiva o negativa de acuerdo con la coagulación o no del plasma. Los resultados de todos los procedimientos llevados a cabo se registraban en las hojas de trabajo del laboratorio y se reportaban verbalmente y por medio del sistema de información del laboratorio a los médicos tratantes. No se hacía la PCD a partir del vial en caso de observar otros tipos de microorganismos además de los cocos grampositivos en acúmulos. Los viales con crecimiento de cocos grampositivos en acúmulos se subcultivaban en agar sangre de cordero al 5% y se incubaban por 18 a 24 horas a 35 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Una vez obtenido el crecimiento puro del microorganismo se procedía a hacer la prueba de la coagulasa, agregando una colonia de la cepa cultivada a un tubo con 0,5 mL de plasma humano y dejándolo en incubación a 35 °C por 4 horas. En ese momento se leía e interpretaba la prueba como negativa o positiva. En caso de ser negativa, se incubaba por 18 a 24 horas más a temperatura ambiente y se volvía a leer. Los microorganismos con una prueba de coagulasa positiva se identificaban como *S. aureus* y aquellos con una prueba negativa, como *Staphylococcus spp.*, coagulasa negativa (ECN) o *Micrococcus spp.*, dependiendo del aspecto de la colonia. Semanalmente se controlaba la calidad del plasma humano, empleando las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y de *S. epidermidis* ATCC 12228 como controles positivo y negativo respectivamente.

Estándar de referencia

Como prueba de referencia se tomó el resultado del subcultivo del hemocultivo positivo interpretado por las bacteriólogas asignadas a esta función. Cuando el equipo

detectaba como positivo un hemocultivo, la bacterióloga responsable del proceso en ese momento hacía de inmediato la coloración de Gram y la PCD si observaba cocos grampositivos en acúmulos como flora única, y subcultivaba el hemocultivo en agar sangre. Esta misma persona, o la que llegaba a reemplazarla en el siguiente turno, interpretaba el resultado de la PCD. A las 18-24 horas de incubación del subcultivo, una bacterióloga que podía o no ser la misma que había interpretado la PCD, observaba el crecimiento obtenido en el subcultivo y definía, mediante la prueba de la coagulasa, si la cepa cultivada correspondía a ECN o a *S. aureus*. Esa persona conocía el resultado de la PCD.

Métodos estadísticos

Se calcularon la sensibilidad y la especificidad, los valores predictivos positivo y negativo, las razones de probabilidad positiva y negativa (RP) (*Likelihood Ratio*) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%; también se determinó el rendimiento global de la prueba mediante la exactitud, el índice de Youden y el OR diagnóstico. Para estos cálculos se utilizó el paquete estadístico EPIDAT versión 3.1.

Aspectos éticos

El trabajo contó con la aprobación del Comité de Investigaciones y Ética en investigaciones de la institución.

RESULTADOS

Se hicieron 1.518 PCD, de las cuales 1.107 (72,9%) fueron negativas y 411 (27,1%), positivas. Se cultivaron 446 cepas de *S. aureus* de las cuales 410 tuvieron la PCD positiva, para una sensibilidad del 91,9%. Sólo en un vial de los 411 con la PCD positiva, se aisló un ECN, lo cual determinó una especificidad del 99,8%. El rendimiento de la PCD en los hemocultivos positivos con presencia de cocos en acúmulos en la coloración de Gram se presenta en la tabla n.º 1.

DISCUSIÓN

En este hospital las especies de ECN representan el 80% de los microorganismos que contaminan los hemocultivos y *S. aureus* ocupa el segundo lugar en frecuencia (20%)

Tabla n.º 1. Rendimiento de la prueba de la coagulasa directa en 1.518 hemocultivos positivos con presencia de cocos en acúmulos en la coloración de Gram

| | Estimado puntual | Intervalo de confianza 95% |
|---------------------------|------------------|----------------------------|
| Sensibilidad | 0,919 | (0,893-0,945) |
| Especificidad | 0,998 | (0,996-1,000) |
| Valor predictivo positivo | 0,997 | (0,991-1,000) |
| Valor predictivo negativo | 0,967 | (0,956-0,978) |
| Razón de probabilidad + | 985,4 | (138,9-699,8) |
| Razón de probabilidad - | 0,08 | (0,060-0,110) |
| Exactitud | 0,975 | (0,967-0,983) |
| Índice de Youden | 0,92 | (0,890-0,940) |
| OR diagnóstico | 12,317 | |

entre los aislamientos de casos de bacteriemia (datos no publicados). De acuerdo con estos datos, y dada la importancia clínica de establecer un tratamiento oportuno y de evitar el uso inadecuado de antibióticos, resulta fundamental diferenciar en el menor tiempo posible si el coco grampositivo en acúmulos cultivado en el hemocultivo es un ECN o un *S. aureus*. Para lograr este propósito se han empleado diversas técnicas como la evaluación de la morfología de los cocos observados en la coloración de Gram,¹³ la inoculación directa a partir del vial del hemocultivo positivo a paneles de identificación e interpretación por métodos automatizados,^{14,15} la utilización de sondas de hibridación¹⁶ y la reacción en cadena de la polimerasa.¹⁷ La prueba de la coagulasa aún es el estándar de referencia para distinguir el *S. aureus* de las especies de ECN.¹⁸ Existen otras pruebas rápidas que se basan en el principio de la aglutinación con partículas de látex las cuales han demostrado una especificidad igual a la de la prueba de la coagulasa, pero con rangos de sensibilidad muy amplios.¹⁹ Los primeros estudios en los que se intentó determinar a cuál grupo correspondía el microorganismo presente en el hemocultivo utilizaron las técnicas de aglutinación y obtuvieron resultados similares a los anteriormente reportados cuando se empleaban directamente con la cepa bacteriana: especificidad del 100%, pero con porcentajes de sensibilidad demasiado bajos para ser clínicamente aceptables.²⁰⁻²² MacDonald y Chapin²³ emplearon la PCD y la compararon con dos

estuches comerciales de aglutinación con partículas de látex e informaron que la sensibilidad era de 79,5% para la PCD frente a sensibilidades de 10,2% y 12,8% para las técnicas de aglutinación. Con base en estos hallazgos decidimos aplicar esta metodología en nuestro laboratorio bajo las condiciones anteriormente descritas. Nuestra investigación incluyó 1.518 hemocultivos, número que supera a los de otros autores que emplearon la misma técnica, que variaron de 80 a 1.303.²³⁻²⁷ Comparando nuestros hallazgos con los de estudios que utilizaron la PCD con algunas variaciones, como el tipo de plasma empleado o el tiempo de incubación, la especificidad del 99,8% encontrada por nosotros está en el rango reportado por otros autores, que varió de 98,7% a 100%.²³⁻²⁷ El único falso positivo que hallamos se pudo deber a una interpretación incorrecta de la prueba por parte de la persona responsable de hacerla o a algún factor presente en la muestra o en el plasma utilizado que produjo la coagulación. La sensibilidad del 91,9% encontrada por nosotros, interpretando la prueba a las cuatro horas de incubación, superó a la del 79,5% informada por MacDonald y Kimberly, quienes no hallaron diferencias entre la interpretación a las dos y cuatro horas de incubación.²³ La sensibilidad de la PCD en nuestras manos, junto con la de Speers y colaboradores²⁵ del 92%, son las máximas encontradas en los estudios revisados, en los que la sensibilidad se halló entre el 65% y el 87%.^{23,24,26,27} Es evidente que el encontrar la causa de los falsos negativos permitiría obtener una prueba de mayor eficiencia, ya que su valor predictivo positivo es excelente. Una de las limitantes de la técnica es la subjetividad de su interpretación principalmente cuando la reacción es débil, como se evidenció en la observación descrita por Qian y colaboradores,²⁷ en la cual la sensibilidad de la prueba, interpretada por una misma persona, pasó a las dos horas del 34% al 65%, y a las cuatro horas del 65% al 90%. Lo anterior demuestra que el resultado de la prueba puede depender de la experiencia de quien la está interpretando. Desafortunadamente esta estrategia no es aplicable en los laboratorios clínicos en los que, por lo general, es un grupo de personas el responsable de asumir estas funciones, puesto que el equipo automatizado detecta los hemocultivos como positivos en cualquier momento, y por ende se deben procesar de inmediato para aprovechar esta ventaja comparada con el método de interpretación visual. Con respecto al momento en que se interpreta la prueba, en el trabajo

de MacDonald y Chapin²³ se menciona que no encontraron diferencias entre las dos y las cuatro horas; por el contrario, Qian y colaboradores²⁷ hallaron una diferencia significativa en la sensibilidad de la PCD, que fue del 34% a las dos horas y del 65% a las cuatro horas. En nuestro estudio no consideramos esta variable. Otra posible causa de falsos negativos para tener en cuenta es el bajo inóculo bacteriano presente en la muestra, aunque es difícil de sustentar porque, al menos en teoría, la cantidad de microorganismos presente en los viales tuvo que haber alcanzado un punto crítico y aproximarse al estándar para ser detectado como positivo por parte del equipo automatizado lector de hemocultivos. También hay que considerar el tipo de plasma empleado; sin embargo, la sensibilidad del 92% reportada por Speers y colaboradores,²⁵ empleando plasma de conejo, y la nuestra del 91,9% junto con la del 87% hallada por Cooke y colaboradores,²⁴ ambos grupos empleando plasma humano, hace improbable que esta variable tenga alguna influencia, al menos en los resultados globales de la prueba. Varetas y colaboradores²⁸ sugirieron que el anticoagulante presente en el vial del hemocultivo podría impedir la coagulación del plasma al efectuar la prueba. Para evitar esta interferencia diluyeron la muestra en solución salina antes de agregarla al plasma. Sin embargo, aunque su sensibilidad aumentó del 62% al 89% sin afectar la especificidad, sus cifras no logran superar las encontradas por nosotros. En nuestro concepto la PCD es una técnica económica que permite, por su alto valor predictivo positivo, asegurar casi con certeza a las 4 horas de observados los cocos grampositivos en acúmulos en el hemocultivo, que se trata de un *S. aureus*. En nuestro laboratorio el resultado de la PCD se informa de manera verbal al médico tratante y por escrito en el sistema de información del laboratorio, agregando esta observación: "Recuerde que esta es una prueba presuntiva".

Declaración de conflicto de intereses

La presente investigación se llevó a cabo como parte del proceso diario del Laboratorio de Microbiología y por iniciativa propia; por tanto, no subyace ningún interés que pudiera haber intervenido en la metodología o en las conclusiones del trabajo. No se recibió ningún tipo de apoyo por parte de las compañías productoras de los reactivos empleados en el estudio.

Financiación

Este estudio no contó con financiación pública o privada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med* 1987; 106: 246-253.
2. Roberts FJ, Geere IW, Coldman A. A three-year study of positive blood cultures, with emphasis on prognosis. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 34-46.
3. Schiffman RB, Strand CL, Meier FA, Howanitz P. Blood culture contamination. A College of American Pathologists Q-Probes Study involving 640 institutions and 497.134 specimens from adult patients. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 216-221.
4. Viagappan M, Kelsey MC. The origin of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *J Hosp Infect* 1995; 30: 217-223.
5. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-243.
6. Weinstein MP, Mirret S, Van Pelt L, McKinnon M, Zimmer BL, Kloos WE, et al. Clinical importance of identifying coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: evaluation of MicroScan Rapid and dried overnight gram-positive panels versus a conventional reference method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2089-2092.
7. Bates DW, Goldman L, Lee TH. Contamination of blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. *JAMA* 1991; 265: 365-369.
8. Dunagan C, Woodward RS, Medoff G, Gray JL, Casabar E, Smith MD, et al. Antimicrobial misuse in patients with positive blood cultures. *Am J Med* 1989; 87: 253-259.
9. Thuler LCS, Jenicek M, Turgeon JP, Rivard M, Lebel P, Lebel MH. Impact of a false positive blood culture result on the management of febrile children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 846-851.
10. Souvenir D, Anderson DE, Palpant S, Mroch H, Askin S, Anderson J, et al. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antiseptis, pseudobacteremia, and therapy of patients. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1923-1926.
11. Khatib R, Saeed S, Sharma M, Riederer K, Fakihi MG, Johnson LB. Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 181-185.
12. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1418-1423.

13. Murdoch DR, Greenlees RL. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. J Clin Pathol 2004; 57: 199-201.
14. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. J Clin Microbiol 2004; 42: 3734-3738.
15. Diederer BMW, Zieltjens M, van Wetten H, Buiting AGM. Identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 84-86.
16. Oliveira K, Brecher SM, Durbin A, Shapiro DS, Schwartz DR, De Girolami PC, et al. Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol 2005; 41: 889-891.
17. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex bloodscreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2004; 42: 3147-3152.
18. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington, DC.: ASM Press; 2003. p. 384-404.
19. Berke A, Tilton RC. Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1986; 23: 916-919.
20. Doern GV, Robbie LI. Direct identification of *Staphylococcus aureus* in blood culture fluid with a commercial latex agglutination test. J Clin Microbiol 1982; 16: 1048-1051.
21. Rappaport T, Sawyer KP, Nachamkin I. Evaluation of several commercial biochemical and immunologic methods for rapid identification of gram-positive cocci directly from blood cultures. J Clin Microbiol 1988; 26: 1335-1338.
22. Hamoudi AC, Hribar MM. Evaluation of a direct identification method for *Staphylococcus aureus* from blood culture broth. J Clin Microbiol 1988; 26: 1404-1405.
23. McDonald CL, Chapin K. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2-hour tube coagulase test. J Clin Microbiol 1995; 33: 50-52.
24. Cooke RPD, Jenkins CT. Comparison of commercial slide agglutination kits with a tube coagulase test for the rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture. Clin Pathol 1997; 50: 164-166.
25. Speers DJ, Olma TR, Gilbert GL. Evaluation of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures. J Clin Microbiol 1998; 36: 1032-1034.
26. Chapin K, Musgnug M. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2003; 41: 4324-4327.
27. Qian Q, Eichelberger K, Kirby JE. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. J Clin Microbiol 2007; 45: 2267-2269.
28. Varetas K, Mukerjee C, Taylor PC. Anticoagulant carryover may influence clot formation in direct tube coagulase tests from blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43: 4613-4615.

