

Evaluación de un sistema automatizado para la identificación de especies de enterococos*

 11 min.



En el presente trabajo el Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan nos presentan un estudio donde evalúan el sistema automatizado Vitek versión VTK-R 9.01 para la identificación de distintas especies de enterococos.



María Alejandra Blanco(1),
María Belén Mónaco(1),
Horacio Angel Lopardo(2*)

1. Bioquímica.
2. Doctor en Ciencias Bioquímicas.
* Servicio de Microbiología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Combate de los Pozos 1881. 1245 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
Acta BioquímClínLatinoam 2010; 44 (2): 239-42
Código bibliográfico: ABCLDL
ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea
ISSN 1852-396X (CD-ROM)



Prof. Dr. Horacio A. Lopardo
Servicio de Microbiología
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Argentina
E-mail: hlopardo@garrahan.gov.ar

Turbidimetría

Los métodos de inmunturbidimetría de **Biosystems** brindan resultados rápidos y fiables gracias a su precisión y sensibilidad para el diagnóstico y seguimiento a pacientes.

Proteína C reactiva (PCR)
PCR hs
Factores reumatoideos
Anti-Streptolisina (ASO)
IgG
IgA
IgM
Complemento C3
Complemento C4
Ferritina
Transferrina
Microalbuminuria
Hemoglobina Glicosilada HbA1c



- ▶ Adaptables a la mayoría de autoanalizadores del mercado.
- ▶ Trazabilidad a estándares recomendado por la IFCC.
- ▶ No requieren prediluciones ni tratamiento previo de muestras.
- ▶ Alta estabilidad hasta la fecha de caducidad.
- ▶ Sin interferencia por lipemia, factores reumatoideos, hemoglobina o bilirrubina.
- ▶ Reactivos listo para su uso en técnicas por inmunturbidimetría (antisuero) y bireactivos para técnicas por látex sensibilizado.

alere.com

ALERE

14 de Julio 618, Buenos Aires Argentina
Tel: (011) 4554-4007 Fax: 4553-2141



Resumen

El sistema Vitek ha demostrado una buena correlación con los métodos convencionales en la identificación de enterococos aislados de materiales clínicos. Sin embargo, su eficacia ha sido cuestionada especialmente en la identificación de especies menos frecuentes. El objetivo de este trabajo fue verificar la identificación de aislamientos seleccionados de distintas especies de enterococos a través de este sistema. Se estudiaron 100 aislamientos de enterococos: *Enterococcus faecalis*(25), *Enterococcus faecium*(25), *Enterococcus gallinarum*(21), *Enterococcus casseliflavus*(2), *Enterococcus raffinosus*(16), *Enterococcus durans*(4), *Enterococcus hirae*(2), *Enterococcus mundtii*(1) y *Enterococcus avium*(4). El criterio empleado fue considerar como correcta una identificación que proveyera más del 90% de confiabilidad. Los casos en que se obtuvieron porcentajes menores fueron corregidos (a) por lectura de las pruebas impresas por Vitek, (b) por lectura ocular en el punto final y/o (c) con el agregado de pruebas adicionales (movilidad y fermentación del alfa-metil-D-glucopiranosido). La identificación correcta se logró en el 56% de los aislamientos y con las correcciones derivadas de a, b y c aumentó al 85%. Se concluye que el sistema Vitek versión VTK-R 9.01 no resulta confiable en la identificación de enterococos si no se efectúan los análisis adecuados según la metodología expuesta en este trabajo.

Palabras clave: Vitek; Enterococo; Identificación

Introducción

El sistema Vitek *software* versión VTK- R 9.01 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) es un sistema automatizado de identificación bacteriana que ha demostrado una alta correlación con métodos convencionales en la identificación de enterococos aislados de materiales clínicos. Sin embargo, su eficacia ha sido cuestionada especialmente en la identificación de especies menos frecuentes. Esta diferencia

se debe fundamentalmente a que *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* dan cuenta de más del 90% de los aislamientos clínicos y éstas son más fácilmente identificables que otras especies (1). El objetivo de este trabajo fue verificar la identificación por Vitek de aislamientos seleccionados de distintas especies de enterococos.

Materiales y Métodos

MICROORGANISMOS

Se estudiaron 100 aislamientos de enterococos: 7 cepas de colección y 93 obtenidos de materiales clínicos: *Enterococcus faecalis*(25), *Enterococcus faecium*(25), *Enterococcus gallinarum*(21), *Enterococcus casseliflavus*(2), *Enterococcus raffinosus*(16), *Enterococcus durans*(4), *Enterococcus hirae*(2), *Enterococcus mundtii*(1) y *Enterococcus avium*(4).

DISEÑO

Se empleó el sistema Vitek versión VTK-R 9.01 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) según las recomendaciones de su fabricante. Simultáneamente, con el mismo inóculo, se utilizó el esquema de identificación bioquímica propuesto por Teixeira y Facklam, como método de referencia (2). Todos los aislamientos fueron procesados por ambos métodos por distintos operadores y en forma ciega.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El criterio empleado fue considerar como correcta una identificación que proveyera más del 90% de confiabilidad. Los casos en que se obtuvieron porcentajes menores fueron corregidos por distintos métodos:

(a) Por lectura de las pruebas impresas por Vitek: se tomaron en cuenta aquellas pruebas consideradas "clave" para la identificación de ciertas especies (p. ej. fermentación de la rafinosa para *E. raffinosus*).

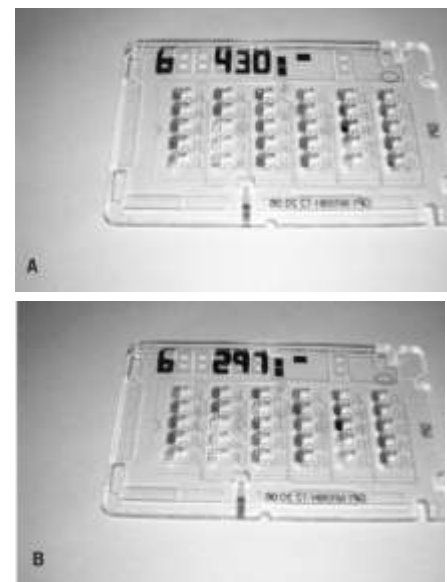
(b) Por lectura ocular de la tarjeta en el punto final: se registraron cambios de color en los

pocillos de las tarjetas en el punto final de lectura (Fig. 1) y se corrigió la identificación en base a pruebas que habían sido mal evaluadas por el aparato como negativas. Cabe destacar que el aparato efectúa una lectura cinética de la reacción.

(c) Con el agregado de pruebas manuales adicionales: movilidad y fermentación del alfa-metil-D-glucopiranosido (MGP).



Figura 1. Lectura de la tarjeta Vitek en el punto final. En A) y B) el informe del Vitek dio el mismo resultado: *E. avium*. A) Prueba de la rafinosa positiva, permitió identificar correctamente al microorganismo como *E. raffinosus*. B) Prueba de la rafinosa negativa, permitió asegurar que la identificación de *E. avium* había sido correcta.



Resultados

La identificación correcta se logró en el 56% de los aislamientos: *E. faecalis* 24/25 (96%), *E. faecium* 19/25 (76%) y otras especies 13/50 (26%) (Tabla I). Los errores se observaron en una cepa de *E. faecalis* mal identificada como *E. faecium*, una cepa de *E. faecium* mal identificada como *E. durans*, dos de *E. gallinarum* mal identificadas como *E. faecium*, una de *E. durans* mal identificada como *Streptococcus uberis* y una de *E. mundtii* mal identificada como *E. faecium*. Cabe destacar que *E. raffinosus* no figura en

la base de datos y que 9 aislamientos de esta especie fueron identificados como *E. avium* y los 7 restantes como *E. avium* / *E. gallinarum*. En los casos en que se obtuvieron resultados de buena concordancia pero difícil diferenciación entre dos especies distintas, el análisis de las pruebas impresas permitió identificar correctamente 3 aislamientos: un caso de *E. gallinarum* / *E. faecium* (la prueba de sorbitol positiva permitió descartar *E. gallinarum*), un caso de *E. faecium* / *E. durans* (la prueba de arabinosa positiva permitió descartar *E. durans*) y un caso de *E. raffinosus* que fue identificado como *E. avium* / *E. gallinarum* (la prueba de rafinosa positiva permitió descartar *E. avium* y la prueba de sorbitol positiva permitió descartar *E. gallinarum*). Teniendo en cuenta otras pruebas que provee el informe del sistema Vitek (arginina, manitol, arabinosa), se logró la identificación correcta final de estos microorganismos. Con la lectura en el punto final (Fig. 1) se logró identificar otros 10 aislamientos: dos casos de *E. faecium* / *E. gallinarum* (la prueba de sorbitol positiva

permitió descartar *E. gallinarum*); un caso de *E. faecium* / *E. durans* (tanto manitol como arabinosa positivas permitieron descartar *E. durans*) y un caso de *E. faecium* / *E. gallinarum* (la inulina positiva permitió descartar *E. faecium*). En 6 casos de *E. raffinosus* los informes de Vitek fueron *E. Avium* / *E. gallinarum* aunque las pruebas



impresas de rafinosa y sorbitol fueran positivas. La rafinosa positiva permitió descartar *E. avium* y la prueba de sorbitol positiva permitió descartar *E. gallinarum*. Con pruebas manuales adicionales recomendadas por el boletín técnico del sistema Vitek (MGP y movilidad positivas) se identificaron 16 aislamientos como *E. galli-*

Tabla I. Resultados obtenidos con el sistema Vitek versión VTK-R 9.01 al emplear distintos aislamientos de *Enterococcus spp.* comparados con el método manual de referencia (6).

Especie	N° total	Bien Id ⁽¹⁾	Pruebas impresas ⁽²⁾	Punto final ⁽³⁾	MGP/ MOV ⁽⁴⁾	Mal Id ⁽⁵⁾
<i>E. faecalis</i>	25	24	0	0	0	1
<i>E. faecium</i>	25	19	2	3	0	1
<i>E. gallinarum</i>	21	2	0	1	16	2
<i>E. casseliflavus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>E. raffinosus</i>	16	0	1	6	0	9
<i>E. durans</i>	4	3	0	0	0	1
<i>E. hirae</i>	2	2	0	0	0	0
<i>E. mundtii</i>	1	0	0	0	0	1
<i>E. avium</i>	4	4	0	0	0	0
Total	100	56	3	10	16	15

¹ Bien identificados sólo considerando el informe de identificación final del Vitek. Cuando Vitek dio como resultado "buena concordancia pero difícil diferenciación entre especies" se indica que se logró una buena identificación con ² si se hizo uso de la interpretación de las pruebas impresas, con ³ si se apeló a una lectura de las tarjetas por punto final (ver Figura 1) y con ⁴ si se agregaron pruebas adicionales sugeridas por el informe de Vitek: alfa-metil-D-glucopiranosido (MGP) y Movilidad (MOV).
⁵ Mal identificados inicialmente por Vitek (no dio señales de duda en casos de identificación errónea).

9na Exposición internacional de limpieza e higiene industrial y empresarial

El único evento especializado para el profesional del sector

ExpoCLEAN

Limpieza e Higiene Profesional

10 al 12 de Junio 2015

14 a 20 hs

Centro Costa Salguero
Buenos Aires - Argentina

www.expo-clean.com.ar

narum. Con las correcciones descritas, el porcentaje de identificación aumentó al 85%.

Discusión y Conclusiones

Las distintas publicaciones en las que el porcentaje de identificación correcta de enterococos a nivel de especie con esta versión del sistema Vitek fue aceptable incluyeron principalmente las dos especies más frecuentemente aisladas de materiales clínicos (*E. faecium* y *E. faecalis*). Tanto Jordá Vargaset *al.*(3) como Visseret *al.*(4) encontraron que todos los enterococos ensayados fueron identificados correctamente a nivel de especie con este sistema. Los primeros ensayaron 22 aislamientos de enterococos, 14 fueron *E. faecalis*, 5 *E. faecium*, y 3 *E. avium*, mientras que Visseret *al.* ensayaron 12 aislamientos de *E. faecalis*. Los trabajos que incluyeron especies menos frecuentes obtuvieron menores porcentajes de identificación correcta. Saderet *al.*(1) ensayaron un total de 369 aislamientos de enterococos, de los cuales 125 fueron *E. faecalis*, 215 *E. faecium*, 12 *E. gallinarum*, 7 *E. avium*, 4 *E. casseliflavus*, 3 *E. hiraе*, 2 *E. raffinosus* y 1 *E. solitarius*, actualmente reclasificado como *Tetragenococcus solitarius*(5). Estos investigadores encontraron que los porcentajes de identificación correcta fueron 98,4%, 98,5% y 89,3% para *E. faecalis*, *E. faecium* y especies distintas de *E. faecalis* y *E. faecium* respectivamente. Cabe destacar que en este estudio sólo 29 enterococos pertenecían a este último grupo y que no se utilizó el método de referencia para el total de los aislamientos. Sólo se evaluaron las discordancias entre API y Vitek, a pesar que es conocido que ambas bases de datos adolecen de defectos similares. D' Azevedo *et al.*(6) ensayaron 40 aislamientos de *E. faecalis*, 14 de *E. faecium* y 25 de otras especies y encontraron que los porcentajes de identificación correcta fueron 87,5% para *E. faecalis*, 85,7% para *E. faecium* y 76,9% para especies distintas de *E. faecalis* y *E. faecium*. Bryce *et al.*(7) ensayaron 118 aislamientos de *E. faecalis*, 19 de *E. faecium* y 3 de *E. casseliflavus*. Los porcentajes de identificación correcta fueron 89,5% y 98,3% para las especies *E. faecium* y *E. faecalis* respectivamente,

mientras que los tres aislamientos de *E. casseliflavus* fueron erróneamente identificados como *E. faecium*. Wilke *et al.*(8) publicaron el primer caso de *E. raffinosus* resistente a vanco-micina que fue mal identificado por Vitek como *E. avium*. Ligozziet *al.*(9) ensayaron 55 aislamientos de *E. faecalis*, 28 de *E. faecium* y 6 de otras especies y encontraron que los porcentajes de identificación correcta fueron 92,7%, 71,4%, y 50% respectivamente. Abele *et al.*(10) evaluaron la capacidad de identificación de un sistema mejorado (Vitek 2, software 4.01) y concluyeron que era necesario agregar pruebas adicionales, (MGP y movilidad) para resolver algunos casos en que dicho sistema no lograba discriminar entre las especies *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Los resultados de este trabajo mostraron que los puntos débiles encontrados en la identificación de enterococos eran fundamentalmente dos: (a) el sistema no fue capaz de discriminar entre las especies *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* y (b) se identificó erróneamente como *E. avium* a las bacterias de la especie *E. raffinosus*, dado que ésta no figura en la base de datos.

Concluyendo, el sistema Vitek versión VTK-R 9.01 no resulta confiable para la identificación de enterococos si no se efectúan los análisis adecuados según la metodología expuesta en este trabajo. Probablemente con los nuevos modelos de Vitek y/o ajustes en las bases de datos puedan obtenerse resultados más alentadores.



Referencias bibliográficas

1. Sader HS, Biedenbach D, Jones RN. Evaluation of Vitek and API 20 S for species identification of enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22: 315-9.
2. Teixeira LM, Siqueira Carvalho MG, Facklam RR. *Enterococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington D.C: ASM Press; 2007. p. 430-42.
3. Jordá Vargas L, Vila A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A, *et al.* Utilidad del sistema Vitek en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2005; 39: 19-25.
4. Visser MR, Bogaards L, Rozenberg-Arska M, Verhoef J. Comparison of the autoSCAN-W/A and Vitek Automicrobic System for identification and susceptibility testing of bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 979-84.
5. Ruoff K. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other catalase-negative, gram-positive cocci. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington D.C: ASM Press; 2007. p. 443-54.
6. D'Azevedo PA, Cantarelli V, Inamine E, Superti S, Dias CAG. Evaluation of an automated system for the identification of enterococci. *Bras Patol Med Lab* 2004; 40: 237-9.
7. Bryce EA, Zemcov SJV, Clarke AM. Species identification and antibiotic resistance patterns of the enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 745-7.
8. Wilke WW, Marshall SA, Coffman SL, Pfaller MA, Edmund MB, Wenzel RP, *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus*: molecular epidemiology, species identification error and frequency of occurrence in a National Resistance Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 43-9.
9. Ligozzi M, Bernini C, Grazia Bonora M, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the Vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1681-6.
10. Abele-Horn M, Hommers L, Trabold R, Frosch M. Validation of Vitek 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 71-6.