

# Detección de *Brucella melitensis* por el sistema BACTEC 9050

José Antonio Lepe<sup>a</sup>, Francisco Javier Guerrero<sup>b</sup>, Antonio Garrido<sup>c</sup> y Rafael Perea<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Sección de Microbiología. <sup>b</sup>Servicio de Medicina Interna. <sup>c</sup>Unidad de Digestivo. <sup>d</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General de Riotinto. Huelva.

**OBJETIVO.** Evaluar el sistema BACTEC 9050 en su capacidad de detección de la bacteriemia por *Brucella* spp.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se estudiaron 16 enfermos con síndrome febril en el transcurso de un brote epidémico por *Brucella* spp. La sospecha de brucelosis fue confirmada serológicamente mediante pruebas de Rosa de Bengala y aglutinación en tubo.

Se procesó un hemocultivo aerobio por paciente. Diez mililitros de sangre fueron inoculados en un frasco aerobio Bactec Plus aerobioic/F e incubado en el sistema automático BACTEC 9050. Los frascos se mantuvieron en incubación 21 días, subcultivándose cuando el aparato detectaba crecimiento o en su defecto se le realizó un pase ciego de salida a los 21 días.

**RESULTADOS.** De los 16 pacientes estudiados, 13 resultaron ser bacteriémicos (81,2%): 11 fueron detectados por el sistema BACTEC 9050, los 2 restantes por subcultivo en el pase de salida. La media para la aparición de un resultado positivo fue de 149,8 horas (6,2 días). Las detecciones más tempranas se obtuvieron a las 83 horas (3,4 días) y las más tardías a las 245 horas (10,2 días). *Brucella melitensis* biotipo 1 fue la causante del brote epidémico. El estudio comparativo con los sistemas BACTEC 9120 y 9240 muestra diferencias significativas ( $p < 0,03$ ).

**CONCLUSIONES.** En el caso de sospecha de brucelosis, los protocolos de incubación de 5 días no son adecuados para el sistema BACTEC 9050, y los de 7 días se sitúan en el borde de detección del sistema mostrando sólo el 69,2% de los casos.

**Palabra clave:** brucelosis, BACTEC 9050, hemocultivo.

Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC 9050 system

**OBJECTIVES.** To evaluate BACTEC 9050 system capacity for detection of bacteremia due to *Brucella* spp.

**MATERIAL AND METHODS.** 16 febrile patients were studied during an epidemic infection for *Brucella* spp. Suspicious of brucellosis was serologically confirmed with Rose Bengal test and agglutination tube test.

Only one blood culture was processed per patient. Ten millilitres of blood were inoculated in a Bactec Plus aerobic/F bottle and incubated in BACTEC 9050 automatic system. The bottles were kept in incubation during 21 days, and they were subcultured when the machine detected its growth; if not, a blind subculture was performed after 21 days.

**RESULTS.** 13 of 16 patients showed bacteriemia (81.2%): 11 patients were detected by BACTEC 9050 system and 2 patients by blind subculture after 21 days. A positive result appeared in 149.8 hours (6.2 days) as a mean. Earlier detections were seen in 83 hours (3.4 days) and the latest ones at 245 hours (10.2 days). The aetiology agent of the epidemic infection was *Brucella melitensis* biotype 1.

We found significant differences comparing the BACTEC 9050 with BACTEC 9120/9240 systems ( $p < 0.03$ ).

**CONCLUSIONS.** Incubation protocols of 5 days are not useful for BACTEC 9050 system in the case brucellosis suspicious. Protocols of 7 would detect only 69.2% of the cases.

**Key words:** Brucellosis, BACTEC 9050, blood culture.

## Introducción

En el diagnóstico de la brucelosis los hemocultivos siguen siendo la técnica de elección, ya que éstos resultan positivos en más del 70% de los casos estudiados al inicio de la enfermedad<sup>1-3</sup>. Estos porcentajes de aislamientos están influenciados por una serie de factores que afectan al crecimiento y detección de *Brucella* spp., tales como: la baja producción de CO<sub>2</sub>, que limita la detección de crecimiento en muchos aparatos automáticos; la presencia de polianetolsulfonato que desestabiliza la membrana externa de la bacteria y del inóculo que es un factor inversamente proporcional al tiempo de detección. La bacteriemia en la brucelosis, aunque continua, es extremadamente variable, su magnitud oscila entre 1 y más de 1.000 unidades formadoras de colonias (UFC)<sup>4-6</sup>.

La capacidad de detección de *Brucella* spp., por los sistemas de monitorización continua de hemocultivos ha sido objeto de frecuentes publicaciones en los últimos años, evidenciando en general un acortamiento de los tiempos de detección de la bacteriemia<sup>7</sup>.

Los aparatos de la serie BACTEC 9000 (Becton

Correspondencia: Dr. J. A. Lepe Jiménez.  
C/ Huelva 2, 2º A.  
21660 Riotinto, Huelva.  
Correo electrónico: jalepe@cica.es

Manuscrito recibido el 19-2-2001; aceptado el 28-3-2001

*Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 267-269

Dickinson *Microbiology Systems*) son sistemas de hemocultivos con detección fluorogénica de CO<sub>2</sub> automatizada y no invasora. Dos modelos, BACTEC 9120 y BACTEC 9240 son idénticos en su diseño y difieren únicamente en su capacidad, 120 y 140 frascos respectivamente. Sin embargo existe otro modelo BACTEC 9050 de menor capacidad, 50 frascos, que difiere de los sistemas grandes en que la agitación de los frascos es continua, frente a los grandes que es intermitente. También se diferencian por la presencia de 3 detectores de crecimiento (a los que acceden los botes por rotación) frente a los sistemas grandes de la serie 9000, en los que cada posición de hemocultivos tiene su detector<sup>8</sup>. Aunque todos los aparatos de la serie 9000 utilizan el mismo tipo de botes de hemocultivos, debido a las diferencias técnicas entre los BACTEC 9120 y 9240 y el pequeño BACTEC 9050, ocurre que sus resultados no son equivalentes<sup>9</sup>.

La capacidad de los BACTEC 9120 y 9240 para detectar la bacteriemia por *Brucella* spp., ha sido evaluada arrojando resultados excelentes, no siendo necesario alargar los tiempos de incubación considerados como estándar de 5 ó 7 días. Sin embargo, el sistema BACTEC 9050 no ha sido evaluado en su capacidad de detección de la bacteriemia por *Brucella* spp.

## Material y métodos

Durante la primavera del año 2000, se estudiaron 16 enfermos que presentaron un síndrome febril en el transcurso de una epidemia de brucelosis ocurrida en la zona norte de Huelva por la ingestión de queso fresco no controlado sanitariamente. Todos los enfermos eran adultos, sus edades estaban comprendidas entre los 28 y los 72 años y no estaban siendo tratados con antibióticos. La sospecha de brucelosis fue confirmada serológicamente mediante pruebas de Rosa de Bengala (*Brucelloslide*, bioMerieux. France) y aglutinación en tubo frente a *Brucella* spp. (Linear Chemicals, España).

Al ser pacientes ambulatorios, por razones organizativas y dadas las características de la bacteriemia en la brucelosis, se procesó un hemocultivo aerobio por paciente. Diez mililitros de sangre fueron inoculados en un frasco aerobio Bactec Plus aerobic/F (Becton Dickinson) e incubado en su correspondiente sistema automático BACTEC 9050. Los frascos se mantuvieron en incubación 21 días, subcultivándose cuando el aparato detectó crecimiento o en su defecto se le realizó un pase ciego de salida a los 21 días. Todos los subcultivos se realizaron en agar chocolate (*Chocolat Polyvitex*, BioMerieux. France) y se incubaron en estufa de CO<sub>2</sub> durante 72 horas antes de ser considerados negativos.

Los aislamientos se identificaron presuntivamente como *Brucella* spp., por su tinción de Gram, reacción de catalasa, oxidasa, ureasa y reducción de nitratos.

Para la identificación definitiva de los aislamientos de las muestras se remitieron al Laboratorio Central de Veterinaria (Santa Fe. Granada) y al Laboratorio de Taxonomía del Centro Nacional de Microbiología (Madrid).

En el estudio estadístico se calculó para la serie en estudio la media, mediana, desviación estándar e intervalo de confianza de la media. La serie fue comparada, previa estratificación, con otros trabajos mediante la prueba exacta de Fisher. Se declaró significación estadística para probabilidades menores de 0,05.

## Resultados

De los 16 pacientes estudiados, 13 resultaron ser bacteriémicos (81,2%), de ellos 11 fueron detectados por el

sistema BACTEC 9050, siendo los 2 restantes detectados por subcultivo en el pase de salida a los 21 días de incubación.

Los tiempos de detección individual, así como la media y la mediana de los tiempos, se exponen en la tabla 1. Se puede observar que las detecciones más tempranas se obtuvieron a las 83 horas (3,4 días) y las más tardías a las 245 horas (10,2 días). El 23% de los aislamientos ocurrió a los 5 días y el 69,2% a la semana de incubación.

Los resultados serológicos reflejaron que todos los pacientes eran positivos en la prueba de Rosa de Bengala, oscilando los títulos de aglutinación a *Brucella* spp. 40 y 1.280. No evidenció ninguna relación entre los títulos serológicos y la positividad o velocidad de crecimiento de los hemocultivos.

La identificación definitiva de los aislados reflejó que *B. melitensis* biotipo 1 fue la causante del brote epidémico.

En la tabla 2 aparece la comparación de nuestro estudio con otros realizados con sistemas de detección fluorogénica de CO<sub>2</sub>.

## Discusión

Como se demostró en el estudio de Murray et al<sup>9</sup> los sistemas grandes de la serie BACTEC 9000 no son equivalentes al sistema pequeño BACTEC 9050; de hecho la tasa de recuperación de *Streptococcus pneumoniae* era superior en el aparato pequeño y la velocidad de crecimiento de anaerobios era superior en los sistemas grandes. Estos investigadores sin embargo no evaluaron los sistemas respecto a *Brucella* spp.

En una revisión cuidadosa de la literatura se observa que los sistemas BACTEC 9120 y 9240 tienen un tiempo medio de detección de la bacteriemia por *Brucella* spp. que va desde los 3,5 a los 5 días, con un porcentaje de recuperación a los 7 días de más del 95% de los cultivos positivos<sup>2,5,7</sup>. En nuestro estudio, empleando el sistema BACTEC 9050, el tiempo medio de detección de los culti-

TABLA 1. Resultados obtenidos con el sistema BACTEC 9050

	Tiempo (horas/días)	Rosa Bengala	Aglutinación
Paciente 1	181 / 7,5	Positivo	640
Paciente 2	83 / 3,4	Positivo	640
Paciente 3	90 / 3,7	Positivo	160
Paciente 4	Pase salida	Positivo	160
Paciente 5	153 / 6,3	Positivo	160
Paciente 6	167 / 6,9	Positivo	80
Paciente 7	164 / 6,8	Positivo	320
Paciente 8	245 / 10,2	Positivo	160
Paciente 9	123 / 5,1	Positivo	320
Paciente 10	114 / 4,7	Positivo	640
Paciente 11	159 / 6,6	Positivo	1.280
Paciente 12	Pase salida	Positivo	40
Paciente 13	168 / 7,0	Positivo	320
Paciente 14	No crecimiento	Positivo	160
Paciente 15	No crecimiento	Positivo	160
Paciente 16	No crecimiento	Positivo	320

Hemocultivos positivos: 13 (81,2%). Aislamientos a los 5 días: 3 (23,0%). Aislamientos a los 7 días: 9 (69,2%). Media para la aparición de un resultado positivo: 149,8 horas / 6,2 días. Desviación estándar de la media: 45,9 horas / 1,9 días. Intervalo de confianza de la media (95%): 115-182 horas / 4,8-7,6 días. Mediana para la aparición de un resultado positivo: 159 horas / 6,6 días.

TABLA 2. Comparación de la positividad a los 7 días, entre el sistema BACTEC 9050 y los sistemas BACTEC 9120, BACTEC 9240

	<b>BACTEC 9240. Ref 11</b>	
	Pacientes: 16	p<0,01*
	Positivos: 42	
	Positivos 7 d: 41 (97,6%)	
<b>BACTEC 9050</b>	<b>BACTEC 9240. Ref 12</b>	
Pacientes: 16	Pacientes: 97	p<0,01*
Positivos: 13	Positivos: 97	
Positivos 7 d: 9 (69,2%)	Positivos 7d: 94 (96,9%)	
	<b>BACTEC 9120. Ref 13</b>	
	Pacientes 18	p<0,03*
	Positivos: 18	
	Positivos 7 d: 18 (100%)	

\*Comparación entre los estudios, prueba exacta de Fisher.  
d: días.

vos positivos es de 6,2 días (149,8 horas). Cuando comparamos el porcentaje de positividad de los hemocultivos de nuestra serie al cabo de una semana (69,2%), observamos que difieren significativamente con otros estudios de parecido diseño realizados con los aparatos grandes de la serie BACTEC 9000 (tabla 2): Yagupsky et al<sup>10</sup> 97,6%; Bannatyne et al<sup>11</sup> 96,9%; Ruiz et al<sup>12</sup> 100%. Cuando lo comparamos con el sistema VITAL (bioMerieux, France) que también está basado en la detección fluorogénica de CO<sub>2</sub>, pero con un sistema distinto en la agitación y composición de los frascos, observamos que la tasa de recuperación a los 7 días es inferior al 50%. La mayoría de los aislamientos se obtienen a partir de la semana de incubación, al igual que en nuestro estudio. Esto nos induce a pensar que el tipo de agitación de los frascos, que según Reimer et al<sup>8</sup>, incrementa la cantidad de oxígeno en el medio y el sistema de detección de los cambios de fluorescencia, deben influir en la velocidad de detección de *Brucella* spp. en estos sistemas.

Consideramos que sería necesario un estudio en paralelo entre los sistemas grandes y pequeños para poder comprobar estos resultados, máxime cuando la positividad y el tiempo de detección de *Brucella* spp. en los hemocultivos es dependiente de inóculo inicial<sup>6</sup>.

Todo lo anterior tiene bastante trascendencia ya que las evaluaciones de los sistemas BACTEC 9120 y 9240 extienden a toda la serie 9000 la validez de los protocolos de una semana de incubación para los casos de sospecha de brucelosis. No obstante, como se puede observar en el caso del BACTEC 9050, los protocolos estándar de una semana de incubación no son adecuados y de hecho nos

dejarían más del 30% de casos sin diagnosticar.

## Conclusiones

El BACTEC 9050 detectó la bacteriemia por *B. melitensis* en el 81,2% de los casos, con una media de 6,2 días. Por consiguiente, los protocolos de incubación de 5 días no son adecuados en este sistema en el caso de sospecha de brucelosis y los de 7 días se sitúan en el borde de detección del sistema, ya que mostrarían el 69,2% de los casos.

Los autores consideran necesario recomendar a los usuarios del sistema BACTEC 9050, que en caso de sospechar una bacteriemia por *Brucella* spp. utilicen los protocolos clásicos de incubación de 21 días y el pase ciego de salida antes de considerar el hemocultivo como negativo.

## Bibliografía

1. Bouza E. Bacteremia y septicemia. Monografías clínicas en enfermedades infecciosas (1ª ed.). Barcelona: Ediciones Doyma, 1993; 28-37.
2. Memish Z, Mah MW, Al Mahmoud S, Al Shaland M, Khan MY. *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J Infect* 2000; 40: 59-63.
3. Martín Moreno S, Guinea Esquerdo L, Carreo González P, Visedo Orden R, García Carbajosa S, et al. Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic test. *Med Clin (Bare)* 1992; 98: 481-485.
4. Gamazo CA, Vitas I, López-Goñi I, Díaz R, Moriyon I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 730 a nonradiometric system for hemoculture. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3.200-3.203.
5. Solomon II, Jackson D. Rapid diagnosis of *Brucella melitensis* in blood. some operational characteristics of the Bact/Alert. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 222-224.
6. Zimmerman SJ, Gillikin S, Sofat N, Bartholomew R, Amsterdam D. Case report and seeded blood culture study of *Brucella* bacteremia. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2.139-2.141.
7. Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3.437-3.442.
8. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-465.
9. Murray PR, Hollick GE, Jerris RC, Wilson ML. Multicenter comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1.601-1.603.
10. Yagupsky P, Peled N, Press J, Abu-Rashid M, Abramson O. Rapid detection of *Brucella melitensis* from blood cultures by a commercial system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 605-607.
11. Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2.673-2.674.
12. Ruiz J, Lorente I, Pérez J, Simarro E, Martínez-Campos L. Diagnosis of brucellosis by using blood cultures. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2.417-2.418.