

Infecciones Hospitalarias y Resistencia Antimicrobiana  
Nuevos Desafíos | Curso Online de Profundización

Octubre – Noviembre 2015

# Identificación de *Staphylococcus* coagulasa negativo

**Paulo José Martins Bispo, PhD**

Postdoctoral Research Associate

Ophthalmology, Microbiology and Immunobiology  
Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear  
Infirmary



# Género Staphylococcus

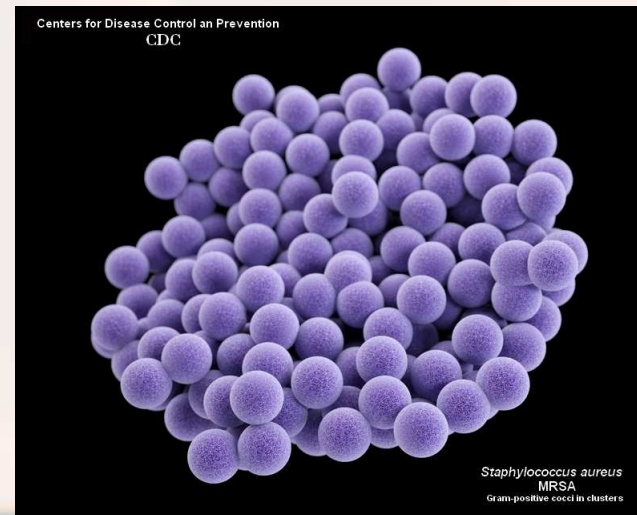
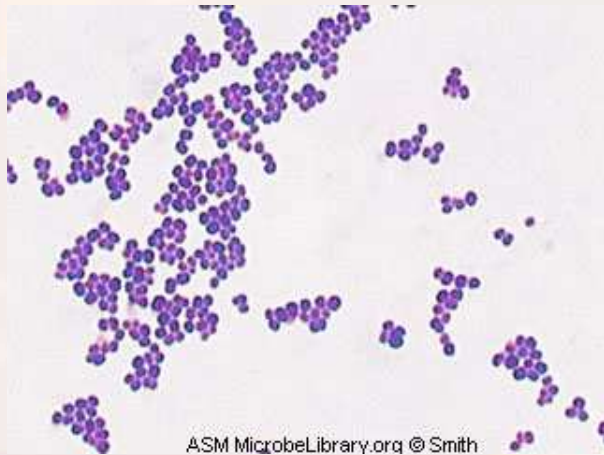
1880

- *Staphyle* - racimo
- *Kokkos* - granos

“My delight may be conceived when there were revealed to me beautiful tangles, tufts and chains of round organisms in great numbers, which stood out clear and distinct among the pus cells and debris...”



Alexander Ogston  
University of  
Alberdeen  
Scotland



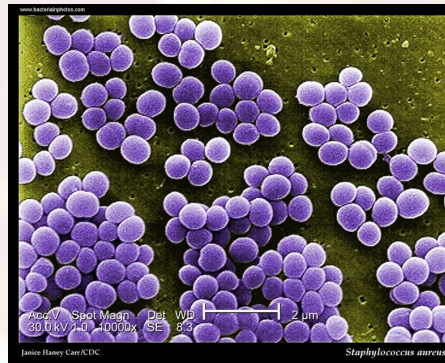
# Género Staphylococcus

## Otras características

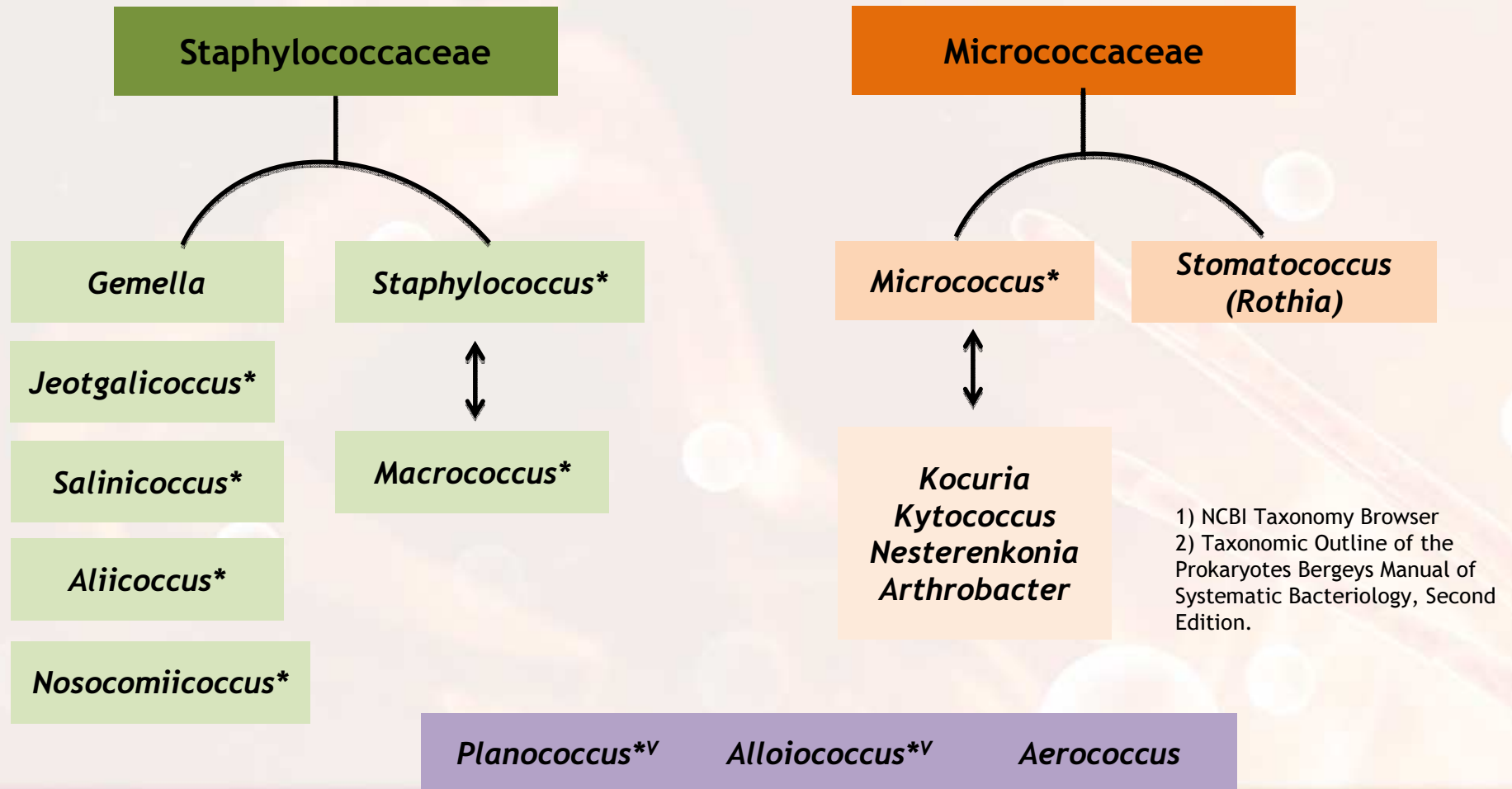
- Catalasa positiva
- Anaerobios facultativos
- Oxidasa negativa
- Sensible lisostafina
- Resistente bacitracina

## Variedad de especies

- 51 especies
- 27 subespecies



# Taxonomía



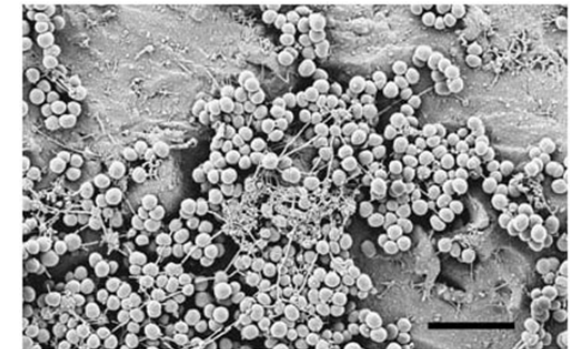
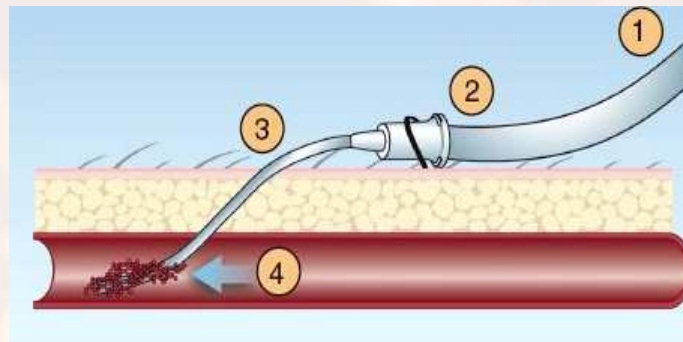
# Staphylococcus coagulasa negativo

- **Microbiota de la piel y las mucosas**
  - *S. haemolyticus* (glándula apocrinas) *S. capitis* (cabeza), *S. saprophyticus* (Tracto Genitourinario)
- **Oportunistas**
  - Formación biofilm dispositivos médicos
- **Clínicamente frecuentes**
  - *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*
    - Infecciones hospitalarias asociadas a inserción de dispositivos invasivos
  - *S. saprophyticus*
    - Infección urinaria en mujeres sexualmente activas



# Importancia clínica de la identificación

- *S. epidermidis*
  - Componente permanente de la microbiota de la piel
  - Más frecuente SCN causando infecciones humanas
  - Infecciones relacionadas biofilm - persistencia
  - Alta resistencia a los antimicrobianos (mayor que *S. Aureus*)
    - Diseminación resistencia a linezolid Américas y Europa
    - Resistencia intermedia y tolerancia (biofilm) vancomicina



Otto M. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67  
de Almeida LM et al. JAC. 2012 Mar;67(3):768-9.  
Mendes et al. AAC. 2012, 56(9):4656.  
Seral C et al. Int J Med Microbiol. 2011;301(4):354-8

# Importancia clínica de la identificación

- *S. lugdunensis*
  - También positivo factor de *clumping*
  - SCN atípico - mayor virulencia infecciones más agresivas
  - Baja resistencia a los antimicrobianos
- *S. saprophyticus*
  - Segunda causa más frecuente de ITU comunitaria
  - Baja tasa de resistencia a los ATB
  - Aislados novobiocina resistencia aislados de otros sitios \*\*

## *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strains causing nosocomial bloodstream infection in Brazil

Izabel Cristina Vanzato Palazzo<sup>1,2</sup>, Pedro A. d'Azevedo<sup>3,4</sup>, Carina Secchi<sup>3</sup>,  
 Antonio Carlos C. Pignatari<sup>4</sup> and Ana Lúcia da Costa Darini<sup>2\*</sup>

**Table 1.** Susceptibility profiles of the isolated staphylococcal strains to several antimicrobials agents (determined by agar dilution and diffusion profiles and cell wall thicknesses measured in SHN strains by TEM)

Strains	MIC (mg/L) <sup>a</sup>											DD <sup>b</sup> FOX (mm)	PFGE profile
	Etest			agar dilution									
	VAN <sup>c</sup>		OXA	CLI	GEN	OFX	PEN	Q/D	CIP	TEC			
	P	D											
SHN 667 <sup>e</sup>	4	4	0.25	0.5	0.25	1	4	1	1	4	28	A1	
SHN 646 <sup>e</sup>	4	32	>256	>256	32	16	64	1	64	32	0	A	
SHN 688 <sup>e</sup>	4	32	>256	>256	32	16	64	0.5	128	64	0	A	
SHN 225 <sup>e</sup>	4	32	>256	>256	16	32	64	1	128	32	0	B	
SHN 499 <sup>e</sup>	4	32	>256	>256	32	16	32	0.5	128	32	0	A	
SHN 943 <sup>e</sup>	4	16	>256	>256	32	16	>256	0.5	128	32	0	A	

1224

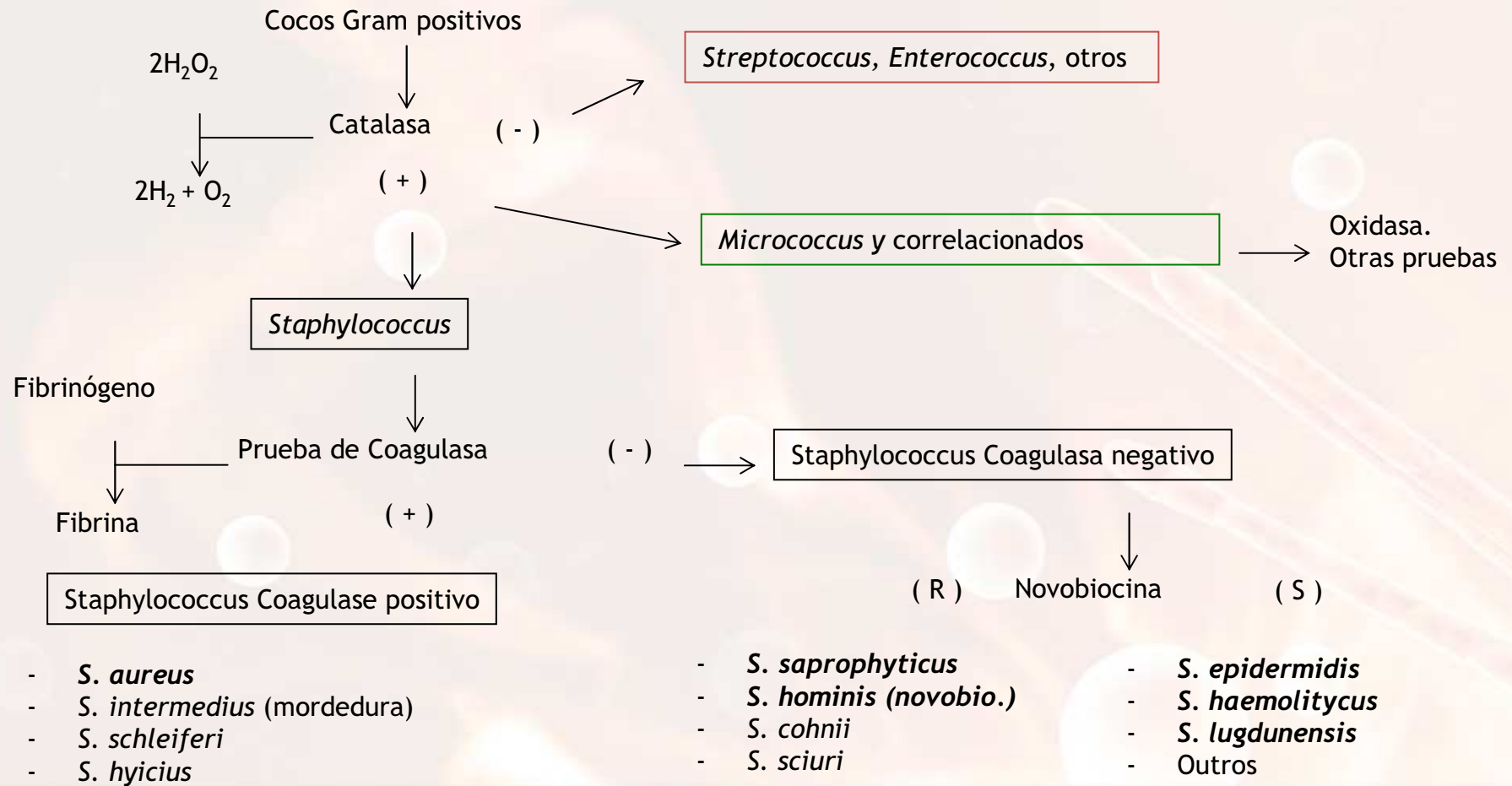
Multi-R

5 aislados con SCCmec tipo III

5 de esas infecciones  
causadas por el mismo clon

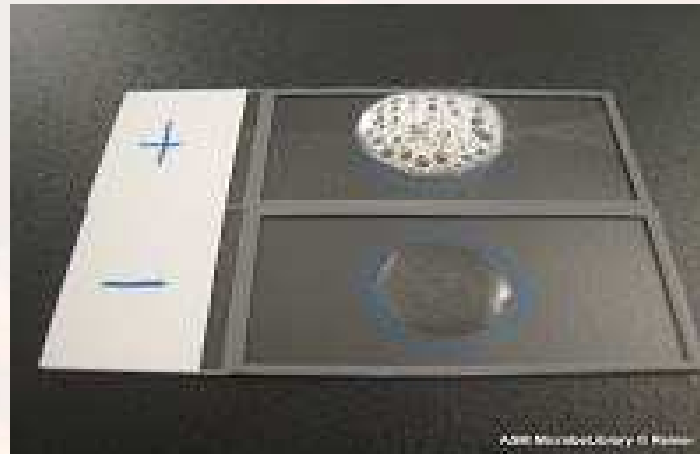
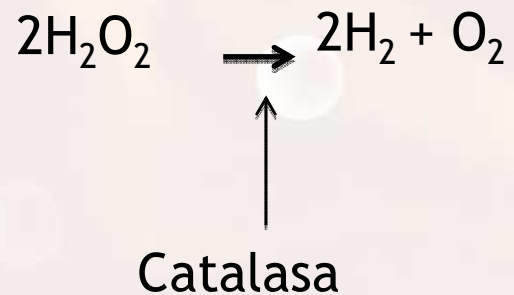


# Flujograma de identificación manual



# Prueba de catalasa

- Formación de burbujas
  - Positivo: Staphylococcus
- Ausencia de burbujas
  - Negativo: Streptococcus, Enterococcus y otros



*S. aureus* en TSA

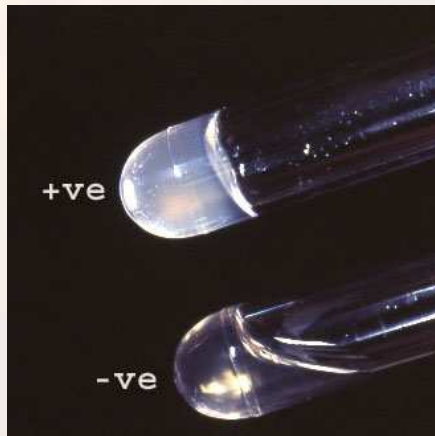
# Prueba de coagulasa y aglutinación

Coagulasa ligada (*clumping factor*)



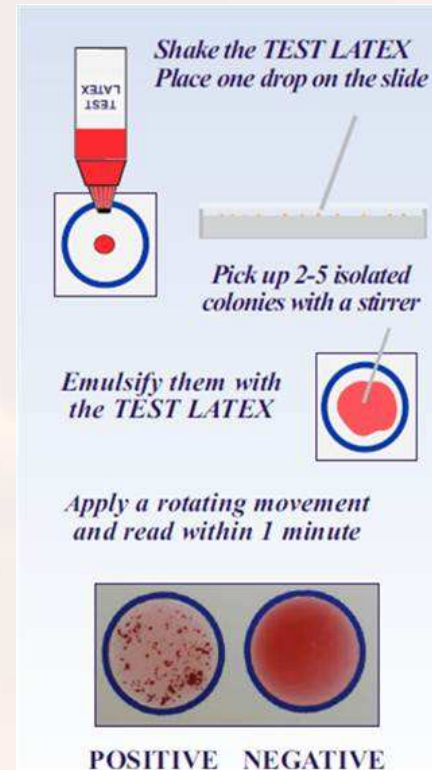
*S. lugdunensis* y *S. schleiferi* positivos

Coagulasa libre



*S. lugdunensis* negativo  
Otros SCP - *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. schleiferi*

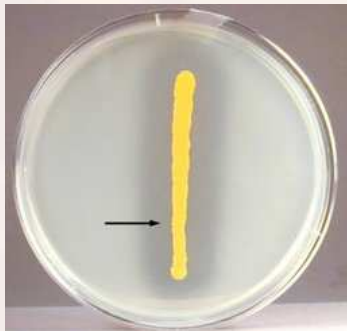
Agglutinación - *Clumping Factor* y Proteína A y Cápsula



# Otras pruebas *S. aureus* vs SCN

## Termonucleasa

- *S. aureus* produce nucleasa termoestable
  - *S. lugdusensis* negativo
  - Otros SCP - *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. schleiferi* - positivos



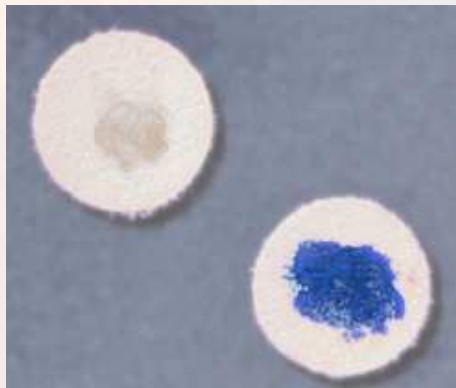
## Fermentación Manitol



Agar Manitol (7.5% - 10% NaCl)

# Micrococcus y relacionados

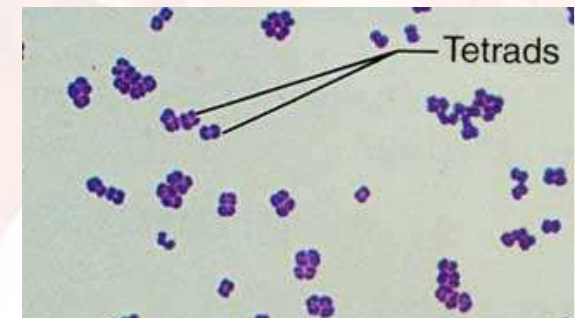
- Microbiota de piel humana - raramente aislado en infecciones humanas
  - *M. luteus*, *Kocuria kristinae* y *Rothia mucilaginosa*
- Pigmento amarillo - *Micrococcus*
- Agrupación - Tétrada
- Oxidasa - *Micrococcus* y *Kocuria*
- Sensibles bacitracina



microdase



Sensibilidad bacitracina

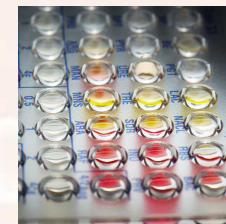




# Paneles de identificación



API ID32 Staph - Biomerieux



VITEK2 - Biomerieux



Phoenix 100 - BD



MicroScan- Beckman  
Coulter

# Métodos automatizados

- Precisión entre 70% - >90% (species level)
- Meta-análisis - 9 estudios incluidos para SCN

ID	Identificación Correcta de SCN (%)				P value
	N aislados	<b>Phoenix</b>	N aislados	<b>Vitek2</b>	
Género	670	<b>98.7</b>	372	<b>99.7</b>	0.113
Especie	895	<b>88.4</b>	740	<b>91.9</b>	0.489

Chatzigeorgiou KS et al. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3284-91.

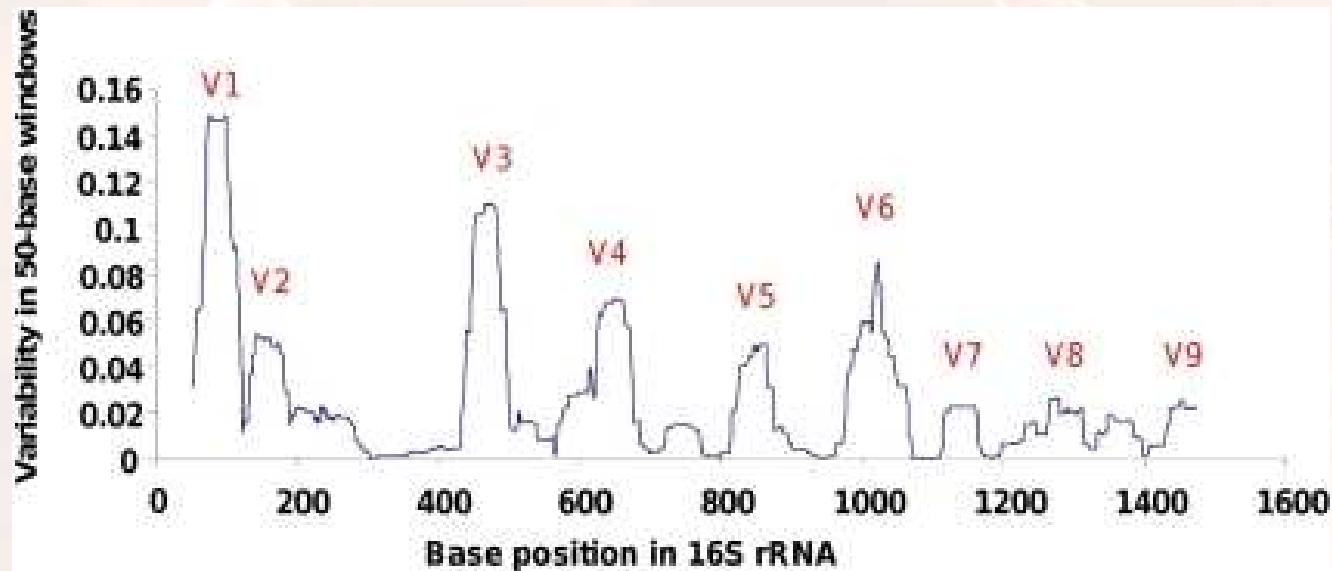
# Métodos automatizados

- Problemas (entre SCN relevancia clínica)
  - *S. hominis* = no identificado o identificado erróneamente
  - *S. epidermidis* = identificado como *S. hominis* u otras especies
  - *S. capitis* = identificado como *S. haemolyticus*
  - *S. haemolyticus* = *S. lentus* o *S. warneri*

F. Layer et al. JCM, Aug. 2006, p. 2824-2830  
Carroll KC et al. JCM, Jun 2006, p. 2072-2077  
Hwang SM et al. JCM, Dec. 2011, p. 4142-4149

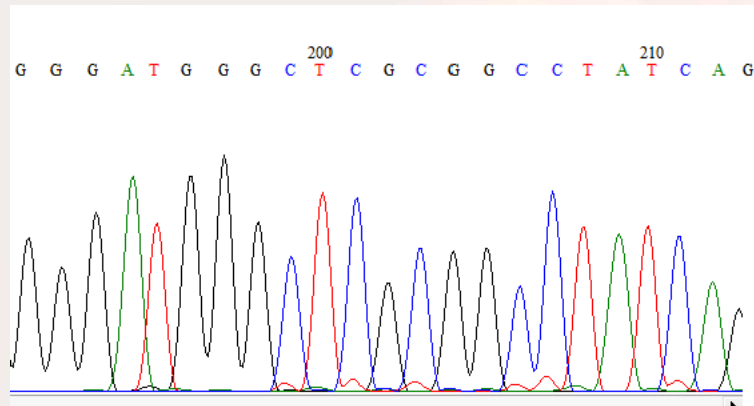
# Identificación molecular

- 16S rDNA



# Identificación molecular

- 16S rDNA



## Públicos

- GenBank / BLAST (NCBI / NIH)
- RDP - Ribosomal Data Project
- DDBJ - DNA Data Bank of Japan
- RIDOM - Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms

## Comerciales

- MicroSeq (Applied Biosystems)
- *SmartGene* IDNS (Smart Gene)

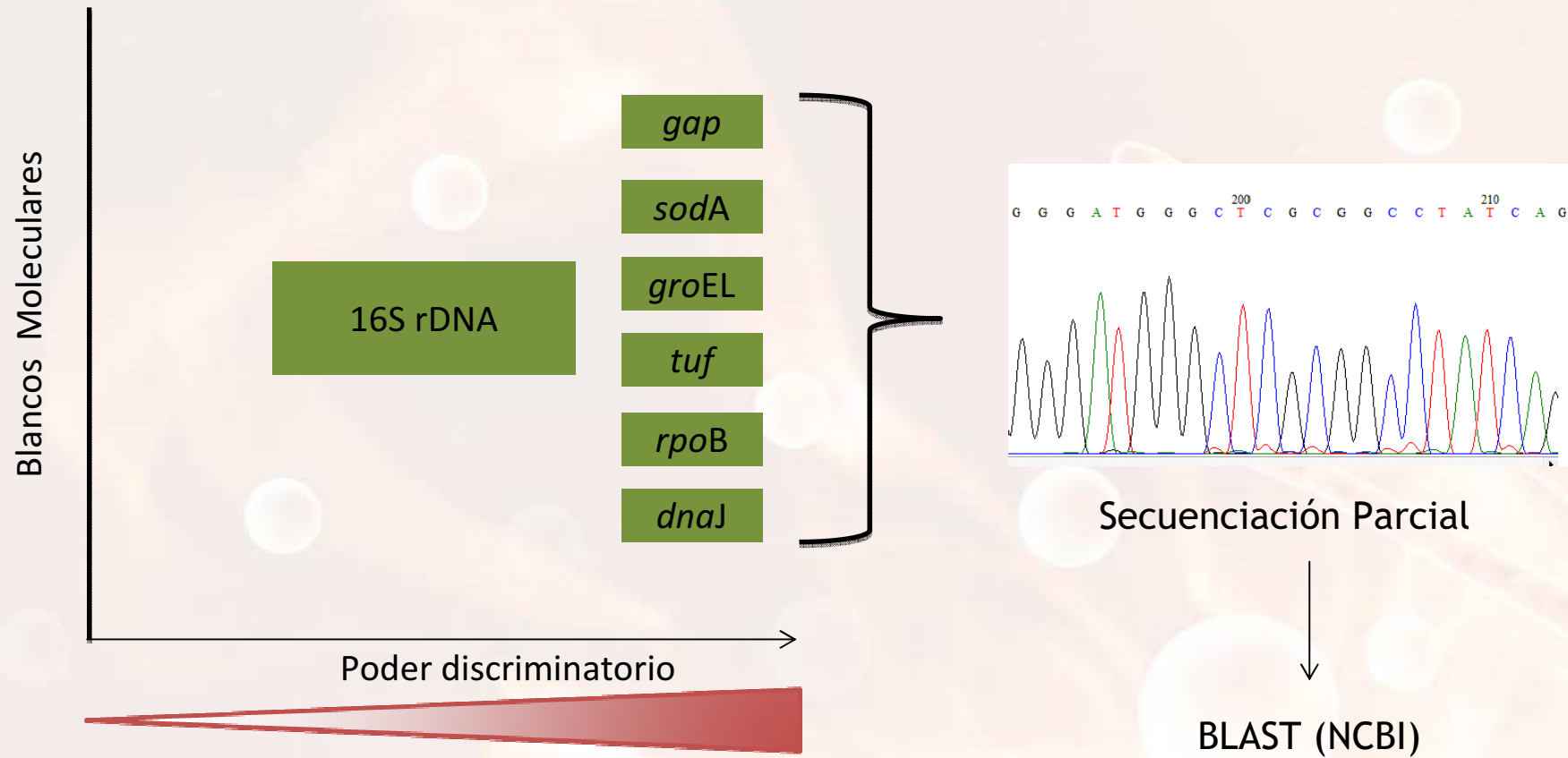
≥ 99% - Identificación especie

<99% - ≥95% - Identificación género

Bosshard et al. J. Clin. Microbiol. 2003;41:4134-4140.

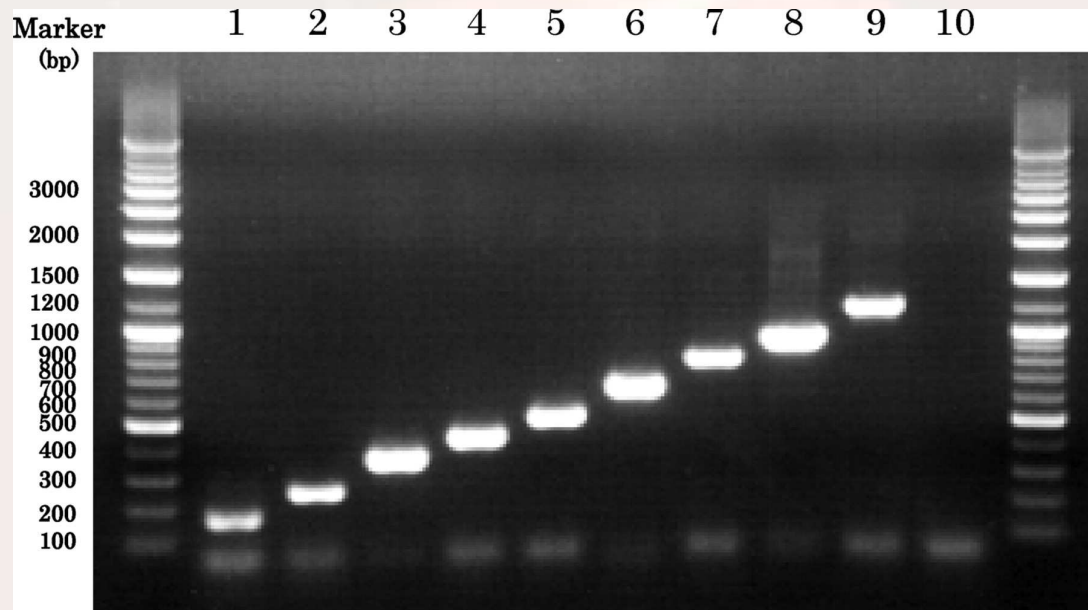


# Otros blancos para secuenciación



# Identificación por Multiplex PCR

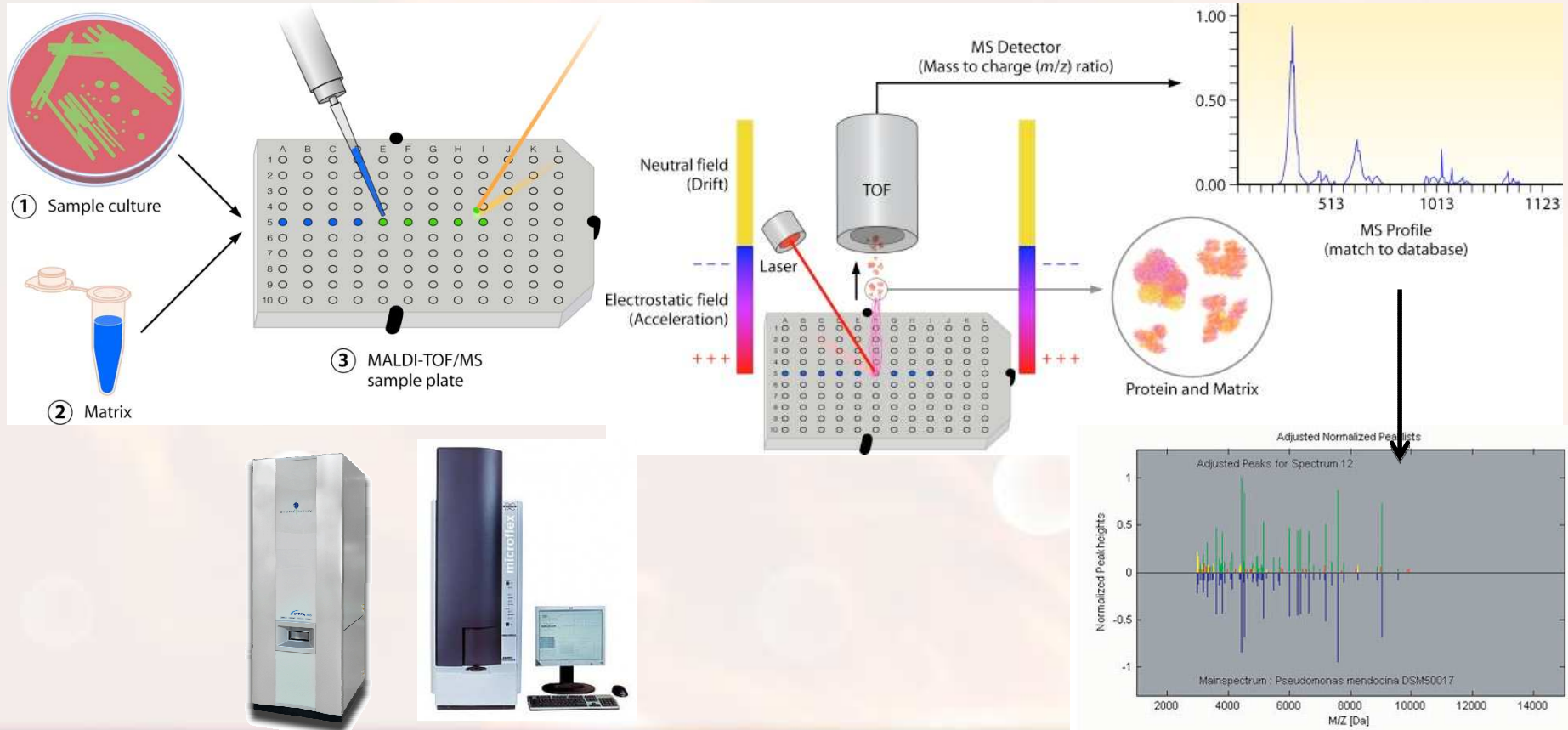
Basado en el gen nuc



- 1 - *S. hominis*
- 2 - *S. epidermidis*
- 3 - *S. aureus*
- 4 - *S. haemolyticus*
- 5 - *S. capitis*
- 6 - *S. lugdunensis*
- 7 - *S. saprophyticus*
- 8 - *S. warneri*
- 9 - *S. caprae*
- 10 - Control negativo

# Identificación por MALDI-TOF

- Ventajas: proceso rápido con buena precisión



# Implementación MALDI-TOF en la rutina

- Johns Hopkins - 12 semanas, 952 aislados testeados
- ID MALDI vs Rutina (Phoenix + Manual)

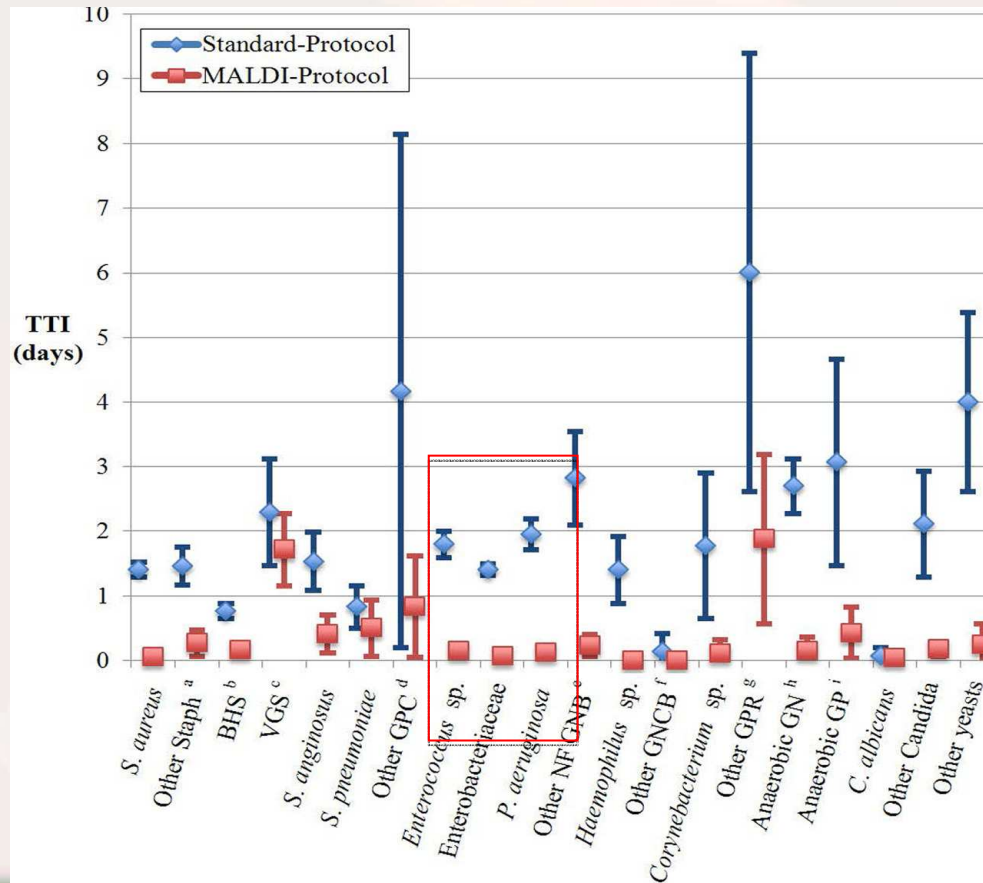
---

Day of Workup	% of Identified Organisms	
	MALDI-TOF	Standard Protocol
1 <sup>st</sup> day	87.2%	9.4%
2 <sup>nd</sup> day	92.8%	61.5%

---

Tan KE et al. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3301-8.

# Implementación MALDI-TOF en la rutina



Tiempo de identificación reducido en hasta 1.45 días, en promedio



# Implementación MALDI-TOF en la rutina

## Costos

Item	Standard protocol cost (\$)	MALDI protocol cost (\$)
Annual reagent costs	158,645.33	29,613.84
Annual labor costs (based on reagent time)	31,323.98	26,669.34
Fixed annual costs of MALDI protocol <sup>a</sup>		31,272.53
		<b>\$ 102,413.00</b>
<b>Total<sup>b</sup></b>	<b>189,969.31</b>	<b>87,555.70</b>

Tan KE et al. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3301-8.

# MALDI-TOF Identificación de SCN

- ATCC (n=25) y aislados clínicos (n=117)
- MALDI-TOF - Bruker Daltonics (BioTyper V3 database)
- Secuenciación *tuf* utilizada como estándar para casos discordantes

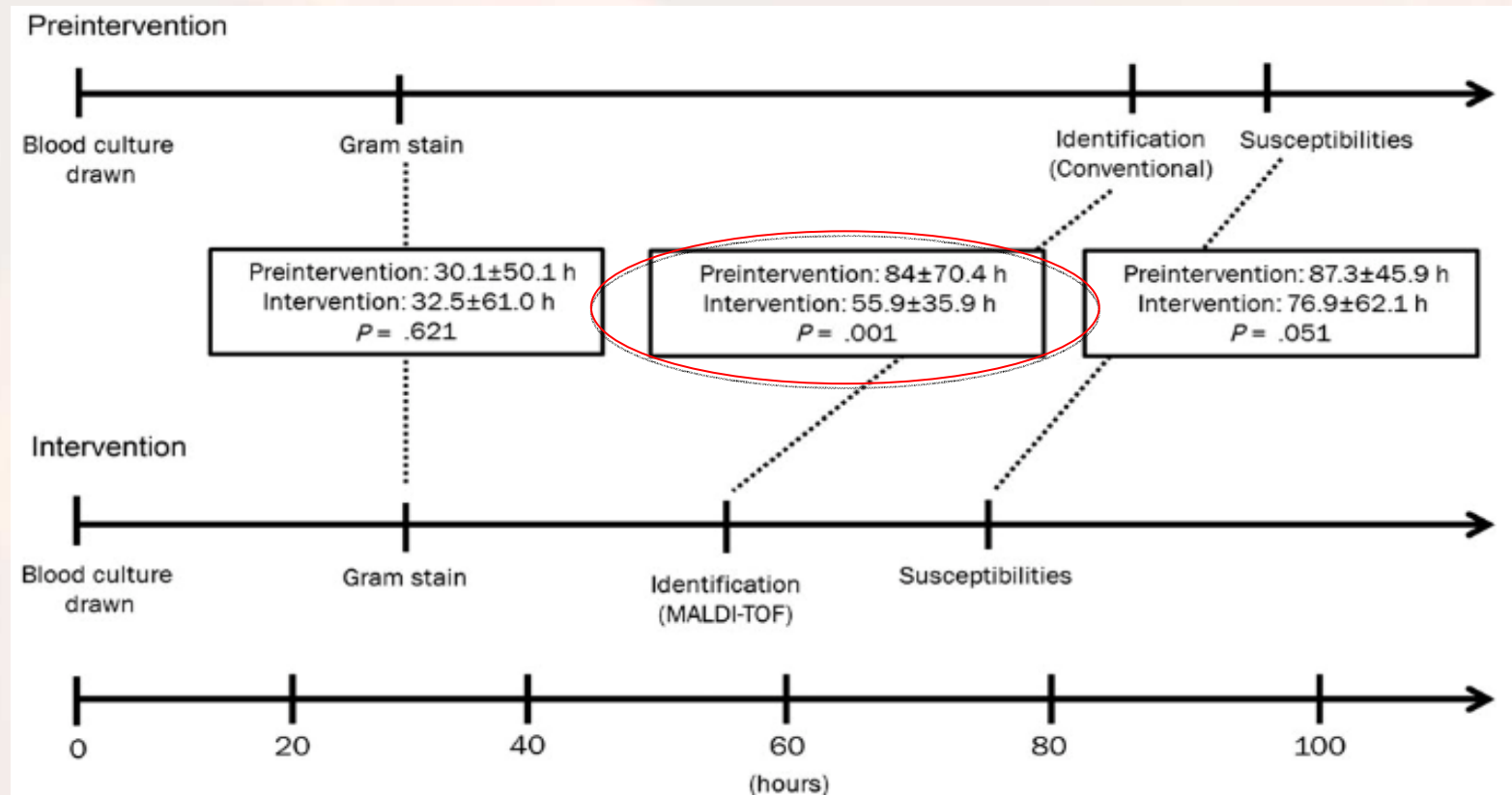
Tasa de especies de SCN correctamente identificadas

Método	(%)
MALDI-TOF	99.3*
VITEK2	92.3
API ID32 Staph	85.9
16S rDNA	70.4

\* 1 *S. hominis* no fue identificado

Loonen AJ et al. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1437-9

## Impacto de la rápida identificación por MALDI-TOF combinada con intervención antimicrobiana en pacientes adultos con bacteremia y candidemia



Huang AM et al. Clin Infect Dis 2013;57(9): 1237-45

## Impacto de la rápida identificación por MALDI-TOF combinada con intervención antimicrobiana en pacientes adultos con bacteremia y candidemia

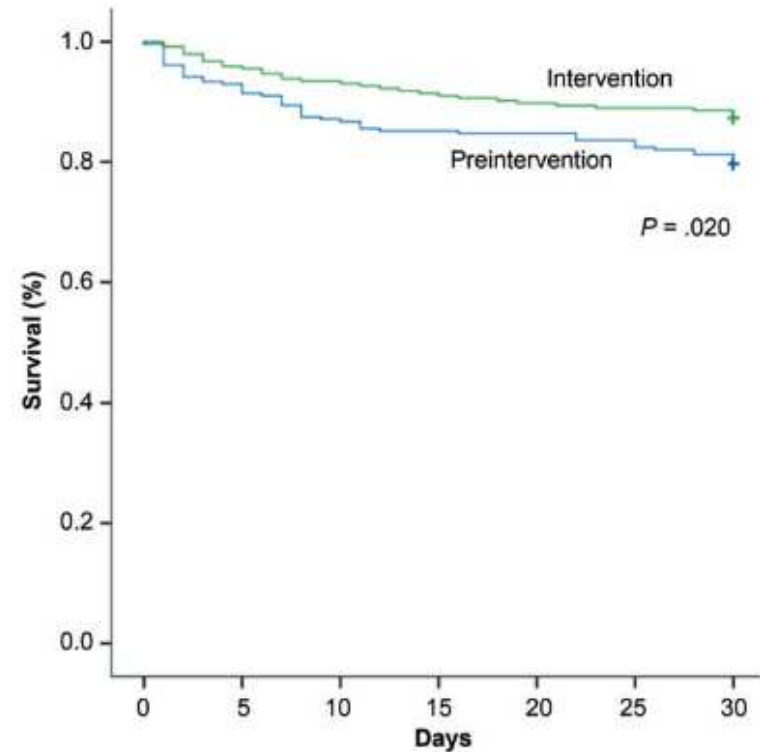
**Table 3. Clinical and Treatment-Related Outcomes**

Outcome	Total		P Value
	Preintervention (n = 256)	Intervention (n = 245)	
<b>Clinical outcomes</b>			
30-day all-cause mortality	52 (20.3)	31 (12.7)	.021
Time to microbiological clearance, d	3.3 ± 4.8	3.3 ± 5.7	.928
Length of hospitalization, d <sup>a</sup>	14.2 ± 20.6	11.4 ± 12.9	.066
Length of ICU stay, d <sup>a</sup>	14.9 ± 24.2	8.3 ± 9.0	.014
Recurrence of same BSI	15 (5.9)	5 (2.0)	.038
30-day readmission with same BSI	9 (3.5)	4 (1.6)	.262
<b>Treatment-related outcomes</b>			
Time to effective therapy, h	30.1 ± 67.7	20.4 ± 20.7	.021
Time to optimal therapy, h	90.3 ± 75.4	47.3 ± 121.5	<.001

Data are No. (%) or mean ± standard deviation.

Abbreviations: BSI, bloodstream infection; ICU, intensive care unit.

<sup>a</sup> Length of hospitalization and ICU stay were defined as time from blood culture positivity to discharge.



**Figure 3.** Kaplan-Meier survival analysis: overall survival in both study groups, censored for patients discharged prior to 30 days.

# Conclusiones

- **Tests automatizados**
  - Buena precisión
  - Identificación de especies
- **MALDI-TOF**
  - Precisión semejante o mejor que los testes automatizados
  - Rápido y simple en la rutina
  - Posible impacto clínico
- **Molecular**
  - Mejor precisión - Gold Standard
  - Laboratorios referencia (mayor complejidad)



**OBRIGADO!**

**¡GRACIAS!**

paulo\_bispo@meei.harvard.edu



**Massachusetts  
Eye and Ear  
Infirmary**

A Teaching Hospital of Harvard Medical School



**HARVARD  
MEDICAL SCHOOL**



Infecciones Hospitalarias y Resistencia Antimicrobiana  
Nuevos Desafíos | Curso Online de Profundización

Octubre – Noviembre 2015

# Identificación de *Staphylococcus* coagulase negativo

**Paulo José Martins Bispo, PhD**

Postdoctoral Research Associate

Ophthalmology, Microbiology and Immunobiology  
Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear  
Infirmary

